

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y  
MIGRACIÓN EN CÁNCER COLORRECTAL**

**TESIS DOCTORAL**

**LORENA BELLIDO HERNÁNDEZ**

**DIRECTORES**

**PROF. D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ**

**DR. D. ÓSCAR BENGOCHEA MIRANDA**

**DRA. D<sup>a</sup>. RAQUEL SEIJAS TAMAYO**

**Salamanca, 2019**



PROF. D. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA,  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DR. D. ÓSCAR BENGOCHEA MIRANDA, DOCTOR EN MEDICINA,  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE  
SALAMANCA

DRA. D<sup>a</sup>. RAQUEL SEIJAS TAMAYO, DOCTORA EN MEDICINA POR LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “ESTUDIO DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y MIGRACIÓN  
EN CÁNCER DE COLON” que presenta la licenciada en medicina Lorena Bellido  
Hernández, ha sido realizado bajo su dirección y reúne, a su juicio, todos los requisitos  
necesarios para ser presentado ante el tribunal correspondiente, a fin de optar al  
Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, se expide el presente certificado.

En Salamanca, a 10 de junio de 2019.

Juan Jesús Cruz Hernández      Óscar Bengoechea Miranda      Raquel Seijas Tamayo



A mis padres,  
gran ejemplo de profesionalidad y humanidad,  
por su constante impulso, apoyo y dedicación.

A Sera,  
por su infinita paciencia, por su ayuda  
y por darme lo mejor.

A Rosa y a Laura,  
por ser mi mayor tesoro.

A mi hermana, Eva,  
por estar siempre ahí y creer en mí.

A Carmen, Fini y Sili,  
por todas las horas de apoyo logístico.



## AGRADECIMIENTOS

Al profesor Juan Jesús Cruz Hernández, director de este trabajo, por su disponibilidad, por transmitirme la pasión por la Oncología, ya desde el pregrado, y por ser un gran ejemplo a seguir. No podía haber elegido un lugar mejor donde formarme.

Al doctor Óscar Bengoechea Miranda, codirector de este trabajo, por su inestimable ayuda para que el proyecto saliera adelante y por su comprensión.

A la doctora Raquel Seijas Tamayo, codirectora, compañera y amiga, por su valioso tiempo y sus sabios consejos.

Al doctor E.del Barco, por facilitarme el camino con su trabajo previo.

A todos los integrantes del Servicio de Oncología Médica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, no sólo por su contribución en el desarrollo de este estudio, sino también por su ejemplo en el día a día.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, por ser parte imprescindible en la obtención de los resultados.

Al laboratorio 13 del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, en especial al Dr. Isidro Sánchez, referente en este campo de investigación, y a Inés González, por su colaboración en la detección de *SLUG*.

A los pacientes que generosamente donan sus muestras para proyectos de investigación.

A todas las personas que de una manera u otra han puesto su granito de arena en este trabajo.





# ÍNDICE



# ÍNDICE

Listado de abreviaturas y siglas.....	18
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>1. EPIDEMIOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
1.1. Incidencia.....	26
1.2. Mortalidad.....	27
<b>2. FACTORES DE RIESGO.....</b>	<b>28</b>
2.1. Edad.....	29
2.2. Factores genéticos.....	29
2.2.1. Cáncer colorrectal hereditario no polipósico.....	30
2.2.2. Síndrome de poliposis familiar.....	30
2.3. Antecedentes familiares de cáncer colorrectal.....	31
2.4. Patología colónica previa.....	31
2.4.1. Cáncer colorrectal esporádico previo.....	31
2.4.2. Pólipos.....	31
2.4.3. Enfermedad inflamatoria intestinal.....	32
2.5. Historia de irradiación abdominal.....	32
2.6. Raza.....	32
2.7. Acromegalia.....	32
2.8. Dieta.....	32
2.9. Otros.....	33
<b>3. GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL.....</b>	<b>33</b>
3.1. Patogénesis molecular del cáncer colorrectal.....	33
3.1.1. La secuencia adenoma-carcinoma.....	33
3.1.2. Vía del pólipo serrado.....	35
3.1.3. Vías moleculares en la tumorigénesis colorrectal.....	36
3.2. Alteraciones moleculares específicas.....	38
3.2.1. Oncogenes.....	38
3.2.2. Genes supresores de tumores.....	39
3.2.3. Genes reparadores.....	40
<b>4. HISTORIA NATURAL.....</b>	<b>40</b>

<b>5. ANATOMÍA PATOLÓGICA.....</b>	<b>42</b>
5.1. Localización.....	42
5.2. Multiplicidad.....	42
5.3. Tipo histológico.....	42
5.4. Grado de diferenciación.....	43
5.5. Inmunohistoquímica.....	43
<b>6. DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>44</b>
6.1. Manifestaciones clínicas.....	44
6.1.1. Manifestaciones locales.....	44
6.1.2. Manifestaciones sistémicas.....	44
6.1.3. Síndromes paraneoplásicos.....	44
6.2. Exploración física.....	45
6.3. Exámenes complementarios y estudio de extensión.....	45
6.3.1. Diagnóstico de naturaleza.....	45
6.3.2. Diagnóstico de extensión.....	45
6.3.3. Otros.....	46
6.4. Estadios.....	46
6.5. Cribado.....	48
<b>7. FACTORES PRONÓSTICOS.....</b>	<b>48</b>
7.1. Factores patológicos.....	49
7.2. Factores clínicos.....	50
7.3. Factores moleculares.....	50
<b>8. TRATAMIENTO.....</b>	<b>51</b>
8.1. Modalidades terapéuticas.....	51
8.1.1. Cirugía.....	51
8.1.1.1. Cirugía radical.....	51
8.1.1.2. Cirugía paliativa.....	52
8.1.1.3. Cirugía sobre la enfermedad localmente avanzada o recidiva local.....	52
8.1.1.4. Cirugía sobre la enfermedad metastásica.....	52
8.1.2. Radioterapia.....	54
8.1.2.1. Adyuvante y neoadyuvante.....	54
8.1.2.2. Paliativa.....	55

8.1.3. Tratamiento sistémico.....	55
8.1.3.1. Como tratamiento primario en enfermedad avanzada.....	55
8.1.3.2. Aduvante.....	58
<b>8.2. Tratamiento por estadios.....</b>	<b>60</b>
8.2.1. Estadio I (T1-2 N0 M0).....	61
8.2.2. Estadio II (T3-4 N0 M0).....	61
8.2.3. Estadio III (ganglios positivos).....	61
8.2.4. Estadio IV (M1).....	61
<b>9. SEGUIMIENTO.....</b>	<b>62</b>
<b>10. ÉTAPAS DE LA PROGRESIÓN METASTÁSICA, IMPLICACIÓN DE E-CADHERINA Y SLUG.....</b>	<b>63</b>
<b>10.1. Crecimiento tumoral.....</b>	<b>64</b>
10.1.1. Células madre cancerígenas ( <i>cancer stem cells</i> ).....	64
<b>10.2. Angiogénesis.....</b>	<b>67</b>
<b>10.3. Invasión local e intravasación.....</b>	<b>67</b>
10.3.1. Adhesión celular.....	67
10.3.1.1. <i>E-cadherina</i> .....	69
10.3.1.1.1. Regulación de la expresión de <i>E-cadherina</i> .....	71
10.3.2. Degradación de la matriz extracelular.....	73
10.3.3. Locomoción de la célula tumoral.....	74
<b>10.4. Transporte e interacción.....</b>	<b>75</b>
<b>10.5. Adhesión.....</b>	<b>75</b>
<b>10.6. Extravasación y migración.....</b>	<b>75</b>
<b>10.7. Metástasis.....</b>	<b>75</b>
<b>11. GENES SNAIL.....</b>	<b>76</b>
11.1. Familia <i>Zinc Fingers</i> , tipo C2H2.....	76
11.2. Funciones de la familia <i>SNAIL</i> .....	78
11.2.1. Transición epitelio-mesénquima (TEM).....	78
11.2.2. Otras funciones de <i>SNAIL</i> .....	80
11.2.2.1. Inductor de supervivencia.....	80
11.3. Células madre cancerígenas ( <i>cancer stem cells</i> ) y genes <i>SNAIL</i> .....	81
11.4. <i>SNAIL</i> como marcador pronóstico.....	82

<b>12. DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....</b>	<b>86</b>
<b>12.1. Técnicas de detección.....</b>	<b>86</b>
<b>12.2. Significado de su detección.....</b>	<b>88</b>
12.2.1. Valor pronóstico.....	88
12.2.2. Valor predictivo de respuesta al tratamiento.....	90
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>93</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>99</b>
<b>1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS.....</b>	<b>101</b>
<b>2. TÉCNICAS DE DETECCIÓN.....</b>	<b>104</b>
<b>2.1. Detección de <i>SLUG</i>.....</b>	<b>104</b>
2.1.1. Análisis de expresión génica por RT-PCR: Síntesis de DNA complementario de cadena sencilla (cDNA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	105
2.1.1.1. <i>Extracción de RNA</i> .....	105
2.1.1.2. <i>Tratamiento de las muestras de RNA con</i> <i>DNAasa I</i> .....	105
2.1.1.3. <i>Síntesis de DNA complementario de cadena sencilla</i> <i>(cDNA)</i> .....	106
2.1.1.4. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	106
2.1.2. Electroforesis del DNA en geles de agarosa.....	107
2.1.3. Tranferencia del DNA a membranas de nylon.....	108
2.1.4. Hibridación con sondas de DNA frente a <i>SLUG</i> .....	109
2.1.5. Revelado.....	110
<b>2.2. Estudio de expresión de E-cadherina.....</b>	<b>111</b>
2.2.1. Fijación de los tejidos.....	111
2.2.2. Métodos de recuperación antigénica.....	112
2.2.3. Cuantificación del resultado inmunohistoquímico.....	112
<b>3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>114</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>117</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA .....</b>	<b>119</b>
<b>2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON CCR LOCALIZADO...</b>	<b>121</b>

2.1.	Características clínicas de los pacientes con CCR localizado.....	121
2.2	Resultados de la determinación de <i>SLUG</i> en los pacientes con CCR localizado.....	123
2.3.	Resultados de la determinación de E-cadherina en los pacientes con CCR localizado.....	124
2.4.	Resultados de seguimiento de los pacientes con CCR localizado.....	125
3.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON CCR METASTÁSICO.....	129
3.1.	Características clínicas de los pacientes con CCR metastásico.....	129
3.2.	Resultados de la determinación de <i>SLUG</i> en los pacientes con CCR metastásico.....	131
3.3.	Resultados de supervivencia en los pacientes con CCR metastásico.....	131
4.	RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>SLUG</i> CON LA EXTENSIÓN TUMORAL.....	132
5.	RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>SLUG</i> CON OTRAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE IMPORTANCIA PRONÓSTICA RECONOCIDA EN LOS PACIENTES CON CCR LOCALIZADO.....	134
5.1.	Relación de la expresión de <i>SLUG</i> con el valor de CEA en los pacientes con CCR localizado.....	134
5.2.	Relación de la expresión de <i>SLUG</i> con el grado en pacientes con CCR localizado.....	136
5.3.	Relación de la expresión de <i>SLUG</i> con el estadio en pacientes con CCR localizado.....	137
6.	RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA CON OTRAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE IMPORTANCIA PRONÓSTICA RECONOCIDA EN LOS PACIENTES CON CCR LOCALIZADO.....	139
6.1.	Relación de E-cadherina con el valor de CEA.....	139
6.2.	Relación de E-cadherina con el grado tumoral.....	140
6.3.	Relación de E-cadherina con el estadio tumoral.....	142

<b>7. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE <i>SLUG</i> EN SANGRE PERIFÉRICA Y DE E-CADHERINA EN TEJIDO TUMORAL.....</b>	<b>143</b>
<b>8. INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE <i>SLUG</i> EN SANGRE PERIFÉRICA Y DE E-CADHERINA EN TEJIDO TUMORAL DE PACIENTES CON CCR LOCALIZADO SOBRE SU SUPERVIVENCIA (SLE Y SG).....</b>	<b>144</b>
<b>8.1. Influencia de la expresión de <i>SLUG</i> y E-cadherina sobre la SLE.....</b>	<b>144</b>
8.1.1. Influencia de la expresión de <i>SLUG</i> sobre la SLE.....	144
8.1.2. Influencia de la expresión de E-cadherina sobre la SLE.	148
8.1.3. Influencia de la expresión de ambos, <i>SLUG</i> y E-cadherina, sobre la SLE.....	150
<b>8.2. Influencia de la expresión de <i>SLUG</i> y E-cadherina sobre la SG en pacientes con CCR localizado.....</b>	<b>151</b>
8.2.1. Influencia de la expresión de <i>SLUG</i> sobre la SG en pacientes con CCR localizado.....	151
8.2.2. Influencia de la expresión de E-cadherina sobre la SG en pacientes con CCR localizado.....	157
8.2.3. Influencia de la expresión de ambos, <i>SLUG</i> y E-cadherina, sobre la SG en pacientes con CCR localizado.....	159
<b>9. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>SLUG</i> CON OTRAS VARIABLES PRONÓSTICAS EN CCR AVANZADO.....</b>	<b>161</b>
9.1. Relación de la expresión de <i>SLUG</i> con el número de localizaciones metastásicas.....	161
9.2. Relación de la expresión de <i>SLUG</i> con la localización de las metástasis (hepática vs otras).....	163
9.3. Relación de la expresión de <i>SLUG</i> con el número de líneas de tratamiento.....	164
<b>10. INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE <i>SLUG</i> EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CCR METASTÁSICO SOBRE SU SUPERVIVENCIA (SLP Y SG).....</b>	<b>166</b>
10.1. Influencia de la expresión de <i>SLUG</i> sobre la SLP.....	166
10.2. Influencia de la expresión de <i>SLUG</i> sobre la SG de los pacientes con CCR metastásico.....	168



<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>171</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>187</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>191</b>



# LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

5-FU: 5-Fluorouracilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*. Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer.

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*. Gen de la poliposis adenomatosa.

BID: *BH3 interacting domain death agonist*. Agonista de muerte de dominio interactivo.

Ca<sup>2+</sup>: Calcio.

CAPOX: Esquema de quimioterapia con capecitabina y oxaliplatino.

CCR: Cáncer colorrectal

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

CEA: Carcinoembryonic antigen. Antígeno carcinoembrionario

CIN: *Chromosomal Instability*. Inestabilidad cromosómica.

CDK: *Cyclin Dependent Kinase*. Quinasa dependiente de ciclinas.

CpG: pares de Citosina y Guanina enlazados por fosfatos (p).

CSC: Cancer Stem Cells. Células madre cancerígenas.

CTCs: *Circulating Tumor Cells*. Células tumorales circulantes.

DCC: *Deleted in Colon Cáncer gene*. Gen suprimido en cáncer colorrectal.

DNA: *Deoxyribonucleic acid*. Ácido desoxirribonucleico.

DFF: *DNA fragmenting factor*. Factor fragmentador de ADN.

E-cadh: E-cadherina.

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

ERKs: *Extracellular Regulated Kinases*. Quinasas reguladas por señal extracelular

FCA: Focos de criptas aberrantes

FGF: *Fibroblastic Growth Factor*. Factor de crecimiento fibroblástico.

FOLFOX: Esquema de quimioterapia con 5-Fluorouracilo, leucovorin y oxaliplatino.

HR: *Hazard Ratio*. Cociente de riesgos instantáneos.

IC: Intervalo de confianza.

kDa: kilodalton.

LOH: *Loss Of Heterozygosity*. Pérdida de heterocigosidad.

MMPs: *Matrix Metalloproteinases*. Metaloproteinasas de matriz.

MMR: *Mismatch Repair*. Genes reparadores de apareamientos incorrectos.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.

MSI: *Microsatellite Instability*. Inestabilidad de microsatélites.

Mts: Metástasis.

OR: *Odds Ratio*. Razón de probabilidades.

PCR: *Polimerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PET: *Positron Emission Tomography*. Tomografía por emisión de positrones.

PI3K: *Phosphoinositide 3-kinase*. Fosfoinositol 3-quinasa.

Rb: Retinoblastoma.

RNA: *Ribonucleic Acid*. Ácido ribonucleico.

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

PIGF: *Placental Growth Factor*. Factor de crecimiento placentario.

RM: Resonancia Magnética.

SEER: *Surveillance, Epidemiology and End Results*. Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales.

Sig.: Significación.

SG: Supervivencia global.

SLE: Supervivencia libre de enfermedad.

SLP: Supervivencia libre de progresión.

TEM: Transición Epitelio-Mesénquima.

TC: Tomografía Computarizada.

Tcf: *T-cell factor*. Factor de célula-T

TNM: *Tumor Node Metastases*. Sistema de estadificación T (Tumor) N (Node, ganglio) M (Metástasis)

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular.

XELOX: Esquema de quimioterapia con capecitabina y oxaliplatino.



# INTRODUCCIÓN





# INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tumor en incidencia, después del cáncer de pulmón y de mama (Figura 1). En nuestro país, teniendo en cuenta ambos sexos, el CCR es el de mayor incidencia. Representa el 15% del total de los diagnósticos de cáncer.<sup>1,2</sup>

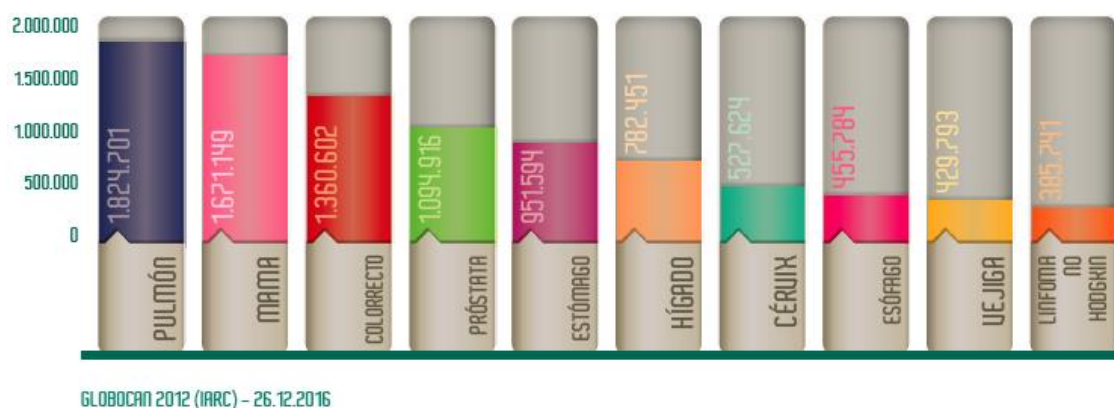
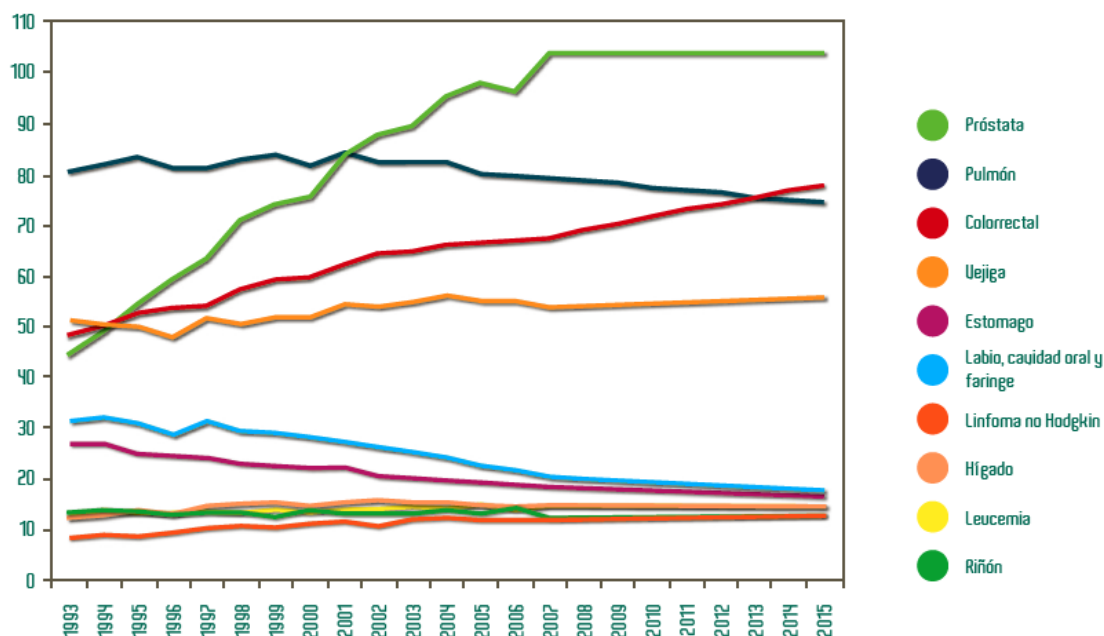


Figura 1. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes a nivel mundial en el año 2012 (ambos sexos)

La gran mayoría son adenocarcinomas y en los últimos años su incidencia está en aumento, posiblemente en relación con factores ambientales y el envejecimiento de la población (Figura 2).

Se han realizado grandes avances en esta patología, tanto en la comprensión de sus bases moleculares como en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.



REDECAN. Cancer Incidence in Spain 2015. Clin Transl Oncol. DOI 10.1007/s12094-016-1607-9

Figura 2. Tendencia de la incidencia de varios tumores en hombres en España.

## 1. EPIDEMIOLOGÍA

### 1.1. Incidencia

Es el tercer tumor maligno en frecuencia en el hombre, después del cáncer de próstata y de pulmón, y el segundo en la mujer, tras el de mama.

En el año 2012 se diagnosticaron 1.4 millones de casos a nivel mundial. En España hay unos 41.441 casos nuevos al año (24.764 en hombres y 16.677 en mujeres)<sup>1,2</sup> (Figura 3).

Su incidencia tiene una clara variación en relación con áreas geográficas, existiendo áreas de alta incidencia como Australia, Nueva Zelanda, Europa y Norteamérica, y áreas de baja incidencia en África y en el centro y sur de Asia<sup>3</sup>.

Estas diferencias geográficas parece que pueden atribuirse a diferencias dietéticas y ambientales, más que a una susceptibilidad determinada genéticamente, ya que los emigrantes adquieren el riesgo del país de destino<sup>4</sup>.



REDECAN. Cancer Incidence in Spain 2015. Clin Transl Oncol. DOI 10.1007/s12094-016-1607-9

Figura 3. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en el año 2015 (ambos sexos).

## 1.2. Mortalidad

El CCR es la segunda causa de muerte por cáncer en España, tras el cáncer de pulmón. Esta enfermedad causa 15.449 muertes anuales en nuestro país (9.244 en hombres y 6.205 en mujeres) <sup>1,2</sup>.



Instituto de Salud Carlos III. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. 2014

Figura 4. Mortalidad estimada por tipo de tumor (10 tumores más frecuentes) en España para el año 2014.

Las tasas de mortalidad por cáncer colorrectal han disminuido progresivamente desde mediados de los años 80 en Estados Unidos y en otros países occidentales. Esto puede deberse al diagnóstico precoz y al desarrollo de tratamientos más eficaces. Por el contrario, las tasas de mortalidad siguen incrementándose en países con recursos más limitados, como en América Central y del Sur y el este de Europa.

En la figura 5 podemos observar la tendencia de mortalidad por CCR en España: En varones es ligeramente descendente a partir del año 1998 (hasta entonces la tendencia era ascendente) y en mujeres es descendente desde el año 1996, con una tasa anual de descenso de 1.4%<sup>5</sup>.

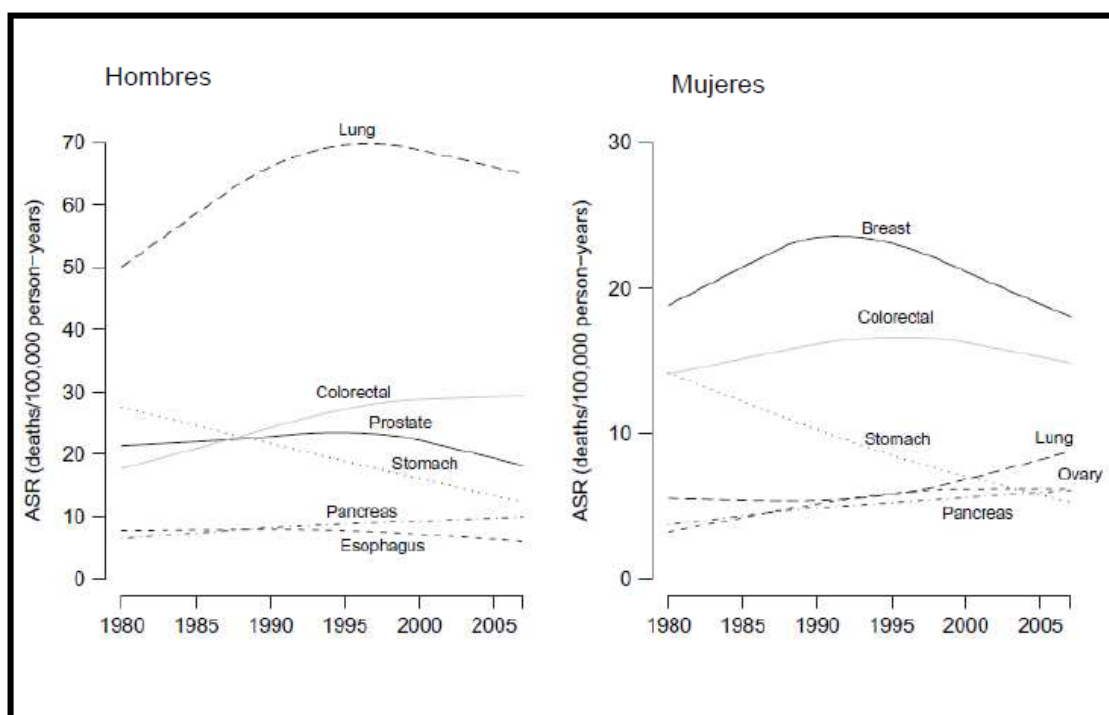


Figura 5. Tendencia de mortalidad por cáncer en España, 1980-2007<sup>5</sup>.

## 2. FACTORES DE RIESGO

El riesgo de desarrollar cáncer colorrectal está influenciado por factores genéticos y ambientales<sup>6</sup>.

Los principales factores que incrementan el riesgo de cáncer de colon y que influyen en las recomendaciones para la detección precoz de esta enfermedad,

son: la edad, los antecedentes personales o familiares de cáncer de colon (o adenomas avanzados o grandes), la enfermedad inflamatoria intestinal y el antecedente de irradiación abdominal <sup>7-13</sup>.

Otros factores de riesgo que se han detectado son la raza negra o la acromegalia <sup>14-15</sup>.

Varios factores modificables, como la obesidad, la diabetes, el tabaquismo, el exceso en la ingesta de alcohol y la falta de ejercicio físico, han sido identificados como factores de riesgo en estudios observacionales, pero por ahora no alteran las recomendaciones para el cribado de cáncer de colon <sup>6</sup>.

En cuanto a la dieta, desde hace tiempo se ha asociado a mayor riesgo de cáncer de colon la ingesta de un exceso de calorías <sup>16-18</sup>, y más recientemente el consumo de carne roja, con una evidencia más fuerte para la carne procesada <sup>19-21</sup>.

## **2.1. Edad**

La edad es un importante factor de riesgo para el cáncer colorrectal esporádico. Este tumor es raro antes de los 40 años, su incidencia empieza a incrementarse a partir de los 40-50 años y la tasa de incidencia se incrementa de manera sostenida década a década. Así, la incidencia es de unos 2 casos por 100.000 habitantes a los 35 años, mientras que llega casi a los 400 después de los 85 años (Figura 6) <sup>6,8</sup>.

## **2.2. Factores genéticos**

Más del 90% de los cánceres colorrectales son esporádicos, el resto lo constituyen ciertos síndromes familiares hereditarios, la mayoría autosómicos dominantes, que se asocian a un riesgo muy alto de desarrollar la enfermedad. Los más frecuentes son el Síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico, y la poliposis adenomatosa familiar <sup>6</sup>.

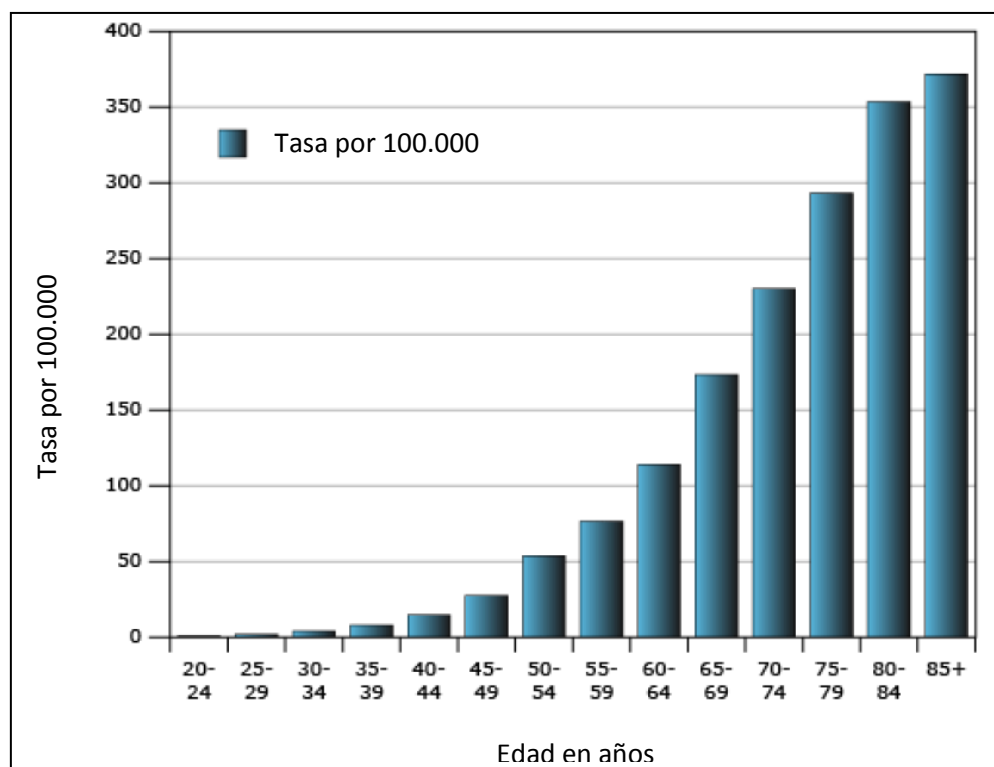


Figura 6. Incremento de la incidencia del cáncer colorrectal con la edad. De: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2002-2006<sup>8</sup>.

### 2.2.1. Cáncer colorrectal hereditario no polipósico

Supone un 3-5% de todos los adenocarcinomas colónicos. El riesgo de presentar cáncer colorectal a lo largo de la vida para estas personas es del 25-75%<sup>6,7</sup>.

Se distinguen dos tipos: Síndrome de Lynch tipo I y síndrome de Lynch tipo II (asociado a otros adenocarcinomas)

Estos pacientes tienen un defecto en los genes MMR (Mismatch repair) y su huella biológica es la inestabilidad de microsatélites (MSI), que se puede detectar mediante PCR (Polimerase Chain Reaction)<sup>6,7</sup>.

### 2.2.2. Síndrome de poliposis familiar

La poliposis adenomatosa familiar y sus variantes (Síndrome de Gardner, Síndrome de Turcot y Poliposis adenomatosa familiar atenuada) suponen menos del 1% de los cánceres colorrectales<sup>6,7</sup>.

- Poliposis adenomatosa familiar: Múltiples pólipos adenomatosos (más de 100) que aparecen durante la adolescencia. Si no se realiza una colectomía profiláctica, el riesgo de cáncer colorrectal a los 45 años es del 90%. Está causada por mutaciones germinales en el gen APC (Adenomatous Polyposis Coli), situado en el cromosoma 5.
- Poliposis adenomatosa familiar atenuada: Se caracteriza por menos adenomas y una edad más tardía de diagnóstico (en torno a los 54 años) También está involucrado el gen APC, pero las localizaciones de las mutaciones son diferentes.
- Síndrome de Gardner: Poliposis colónica, dientes supernumerarios, displasia fibrosa, osteomas, fibromas y quistes sebáceos.
- Síndrome de Turcot: Se acompaña de gliomas.

### **2.3. Antecedentes familiares de cáncer colorrectal**

La historia familiar de cáncer de colon también es un factor de riesgo importante incluso fuera de los síndromes con una predisposición genética definida. El tener un familiar de primer grado diagnosticado duplica el riesgo respecto a la población general. El riesgo aumenta si hay más familiares con cáncer colorrectal o si hay casos con edad inferior a los 50-60 años<sup>9</sup>.

### **2.4. Patología colónica previa**

#### **2.4.1. Cáncer colorrectal esporádico previo**

Los pacientes que han tenido un cáncer colorrectal previo tienen mayor riesgo de desarrollar otro. Un 1.5-3% de los pacientes desarrollan un tumor metacrónico en los 5 años siguientes<sup>7</sup>.

#### **2.4.2. Pólipos**

El antecedente de pólipos adenomatosos en el colon también supone un mayor riesgo de desarrollar un cáncer de colon en el futuro. El riesgo depende del tamaño y del tipo de pólipo. El tener historia personal de un pólipo

adenomatoso grande (>1cm), pólipos vellosos o túbulo-vellosos o con alto grado de displasia, incrementa el riesgo de cáncer de colon, sobre todo si son múltiples. El riesgo relativo para estos pacientes es de 3.5-6.5<sup>10</sup>.

#### **2.4.3. Enfermedad inflamatoria intestinal**

- Colitis ulcerosa: El riesgo aumenta con el tiempo de evolución y la severidad de la enfermedad. Después de los 10 años es del 10-20%<sup>11</sup>.
- Enfermedad de Crohn: Los datos son menos robustos que el caso de la colitis ulcerosa, pero el riesgo también parece incrementarse con la extensión de la enfermedad<sup>12</sup>.

### **2.5. Historia de irradiación abdominal**

Los supervivientes a un tumor en la niñez o adolescencia que recibieron radiación abdominal tienen mayor riesgo de desarrollar neoplasias gastrointestinales, sobre todo cáncer colorrectal<sup>13</sup>.

### **2.6. Raza**

Los afroamericanos tienen las mayores tasas de cáncer colorrectal de todos los grupos étnicos en EEUU. Además, parece que en ellos el desarrollo es a edades más tempranas<sup>14</sup>.

### **2.7. Acromegalia**

Estos pacientes presentan con mayor frecuencia adenomas colónicos y cáncer colorrectal<sup>15</sup>.

### **2.8. Dieta**

Desde hace años los estudios epidemiológicos sobre los hábitos nutricionales y las pautas de emigración, así como estudios experimentales realizados en animales, han puesto de manifiesto que el cáncer colorrectal es



causado o promovido por factores medioambientales, especialmente por factores dietéticos que afectan al microambiente intestinal<sup>6</sup>.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la relación entre la ingesta excesiva de calorías y distintos tipos de cáncer, entre ellos el colorrectal<sup>16-18</sup>.

Además, estudios epidemiológicos han asociado el consumo prolongado de carne roja a mayor riesgo de esta enfermedad, siendo mayor la evidencia para la carne procesada. De hecho, la carne roja ha sido clasificada recientemente por la OMS como Grupo 2A, probablemente cancerígena para los seres humanos, y la carne procesada como Grupo 1, cancerígena para los seres humanos<sup>19-21</sup>.

Por otra parte, algunos datos epidemiológicos sugieren que ciertos tipos de fibra de la dieta pueden reducir el riesgo de este tipo de cáncer al disminuir la exposición de la mucosa a los carcinógenos. El consumo de dietas occidentales, pobres en fibra, con la consiguiente disminución del ritmo intestinal, y ricas en grasas, sobre todo insaturadas, colesterol y sales biliares, constituye un factor de riesgo, ya que promueven la secreción de ácidos biliares, la formación de cetosteroides y cambios en la flora intestinal que conllevan la aparición de sustancias potencialmente carcinogénicas<sup>6,7,22</sup>.

También se ha relacionado con la disminución de la ingesta de vitaminas A, C y E, aunque la dieta suplementaria en estos elementos no ha demostrado tener un efecto beneficioso. Las personas con un incremento en el consumo de calcio y vitamina D presentan un menor riesgo de cáncer de colon. Un efecto protector se ha encontrado en el consumo de pescado, rico en ácido graso omega-3, que reduce la tasa de proliferación en las criptas celulares<sup>6,7,22</sup>.

El consumo de alcohol eleva el riesgo de cáncer colorrectal. Su efecto en la carcinogénesis no es bien conocido, aunque se asocia con el déficit de folatos<sup>22,23</sup>.

## **2.9. Otros**

Algunos estudios han asociado la obesidad<sup>24</sup>, la diabetes mellitus<sup>25</sup>, el tabaquismo<sup>26</sup> y las ureterosigmoidostomías<sup>27</sup> con un incremento del riesgo de cáncer colorrectal.

### 3. GENÉTICA MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL

El nivel de conocimiento de los eventos moleculares en el desarrollo del cáncer colorrectal es mayor que en otros tumores sólidos.

#### 3.1. Patogénesis molecular del cáncer colorrectal

Existen una serie de cambios genéticos que llevan a la transformación del epitelio colónico normal en cáncer invasivo.

##### 3.1.1. La secuencia adenoma-carcinoma

La mayoría de los cánceres colorrectales surgen a partir de adenomas (pólipos adenomatosos) que se hacen displásicos (Figura 7).

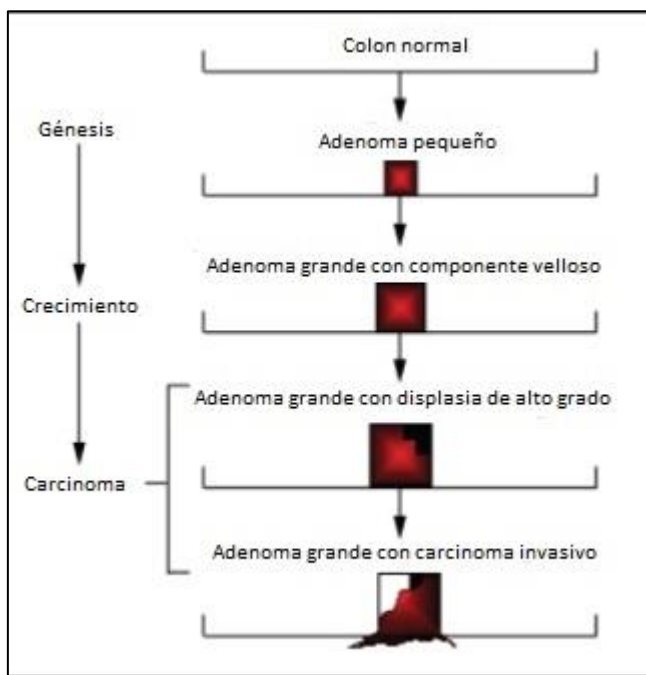


Figura 7. Patogénesis del cáncer colorrectal: Secuencia adenoma-carcinoma.

Adaptado de O'Brien MJ<sup>29</sup>.

Los pólipos adenomatosos se forman en el colon cuando se alteran los mecanismos reguladores de la regeneración epitelial. Típicamente la proliferación ocurre sólo en la base de las criptas y a medida que las células se desplazan hacia la superficie dejan de proliferar y terminan diferenciándose, hasta que posteriormente se pierden en la luz intestinal debido a fenómenos de apoptosis y exfoliación. Este proceso ordenado se altera cuando los adenomas crecen, se hacen displásicos y adquieren potencial invasor.

En 1990 Fearon y Vogelstein describieron las bases moleculares del cáncer colorrectal como un proceso de varias etapas en el que cada evento genético acumulado confería una ventaja proliferativa en las células epiteliales de colon. Posteriores estudios han refinado esta hipótesis<sup>30</sup>.

Según el modelo de Vogelstein, para la transformación maligna se requieren mutaciones germinales o somáticas, y la acumulación de mutaciones genéticas múltiples, más que su secuencia, determina el comportamiento biológico del tumor (Figura 8). Por una parte, mutaciones germinales son las responsables de los síndromes hereditarios (por ejemplo la poliposis adenomatosa familiar o el Síndrome de Lynch), mientras que una sucesiva acumulación de mutaciones somáticas parece ser el mecanismo subyacente en la mayoría de los casos esporádicos. Las mutaciones en el gen APC, una característica común en casos hereditarios y esporádicos, suceden temprano en el proceso, mientras que las mutaciones en el gen supresor de tumores p53 suelen ocurrir más tarde<sup>28</sup>.

Además de las mutaciones puntuales, otros cambios genéticos implicados en la carcinogénesis incluyen alteraciones en la metilación del DNA, reordenamientos genéticos, amplificaciones, sobreexpresión y deleciones<sup>28</sup>.

### **3.1.2. Vía del pólipo serrado**

Aunque la mayoría de los tumores colorrectales proceden de la secuencia adenoma-carcinoma, se ha descrito una ruta alternativa para la carcinogénesis colorrectal, a través de pólipos serrados. Este grupo engloba una variedad morfológica, incluyendo pólipos hiperplásicos, pólipos mixtos hiperplásicos/adenomatosos y adenomas serrados.

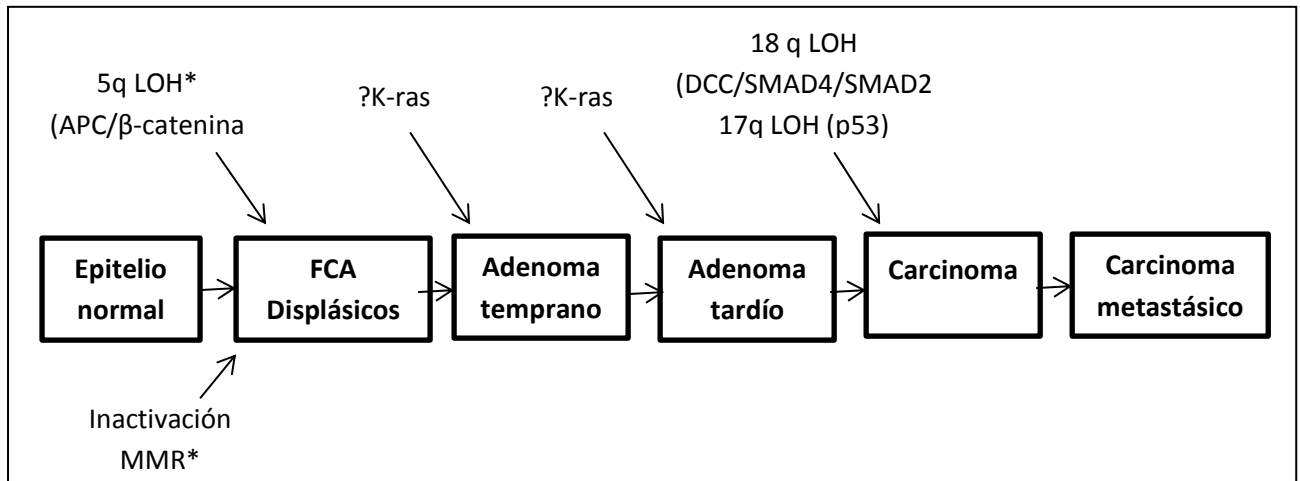


Figura 8. Modelo genético de tumorigénesis del cáncer colorrectal. LOH: loss of heterozygosity, pérdida de heterocigosidad; DCC: deleted in colon cancer gene, gen suprimido en cáncer colorrectal; APC: adenomatous polyposis coli gene, gen de la poliposis adenomatosa; FCA: focos de criptas aberrantes; MMR: DNA mismatch repair enzyme, enzima reparadora del ADN. Adaptado de: Lynch JP<sup>31</sup>.

### 3.1.3. Vías moleculares en la carcinogénesis colorrectal

Aunque la mayoría de las neoplasias colorrectales se inician con la inactivación (a través de una mutación germinal o esporádica) del gen APC y se desarrollan a partir de un adenoma, siguiendo el modelo de Volgestein, algunos pueden aparecer *de novo*, sin existencia previa de una lesión adenomatosa por mecanismos de carcinogénesis diferentes<sup>7,28</sup>.

Se han descrito las siguientes vías moleculares, que pueden llevar a la carcinogénesis colorrectal<sup>7,28</sup> (Figura 9):

- La **vía de inestabilidad cromosómica** (*Chromosomal instability*, CIN) o **vía supresora**, cuyo representante es la poliposis adenomatosa familiar, pero también incluye la mayoría de los casos esporádicos (es responsable del 75-80% de los CCR). Iniciada por alteraciones somáticas en APC. Se asocia frecuentemente con mutaciones en el punto de control kRas y pérdida de función de p53 y otros genes supresores.
- **Vía de la inestabilidad de microsatélites** (MSI), y dentro de ella:

- **Fenotipo mutador:** iniciado por mutaciones en los genes reparadores del ADN. Implicada en síndrome de Lynch. La alteración del mecanismo de reparación hace que se acumulen mutaciones a lo largo de todo el genoma, y son especialmente susceptibles los microsatélites que se encuentran en genes supresores de tumores.
- **Fenotipo metilador o vía serrada:** El mecanismo iniciador parece ser la mutación activadora del gen BRAF, lo que ocasiona una inhibición de la apoptosis a nivel de las células epiteliales del colon y da lugar a las lesiones serradas. Estas lesiones son muy propensas a la metilación de islotes de CpG de las regiones promotoras de múltiples genes, y provocan un silenciamiento epigenético de varios genes. El CCR se produce en último término por inactivación de genes supresores por hipermetilación del promotor.

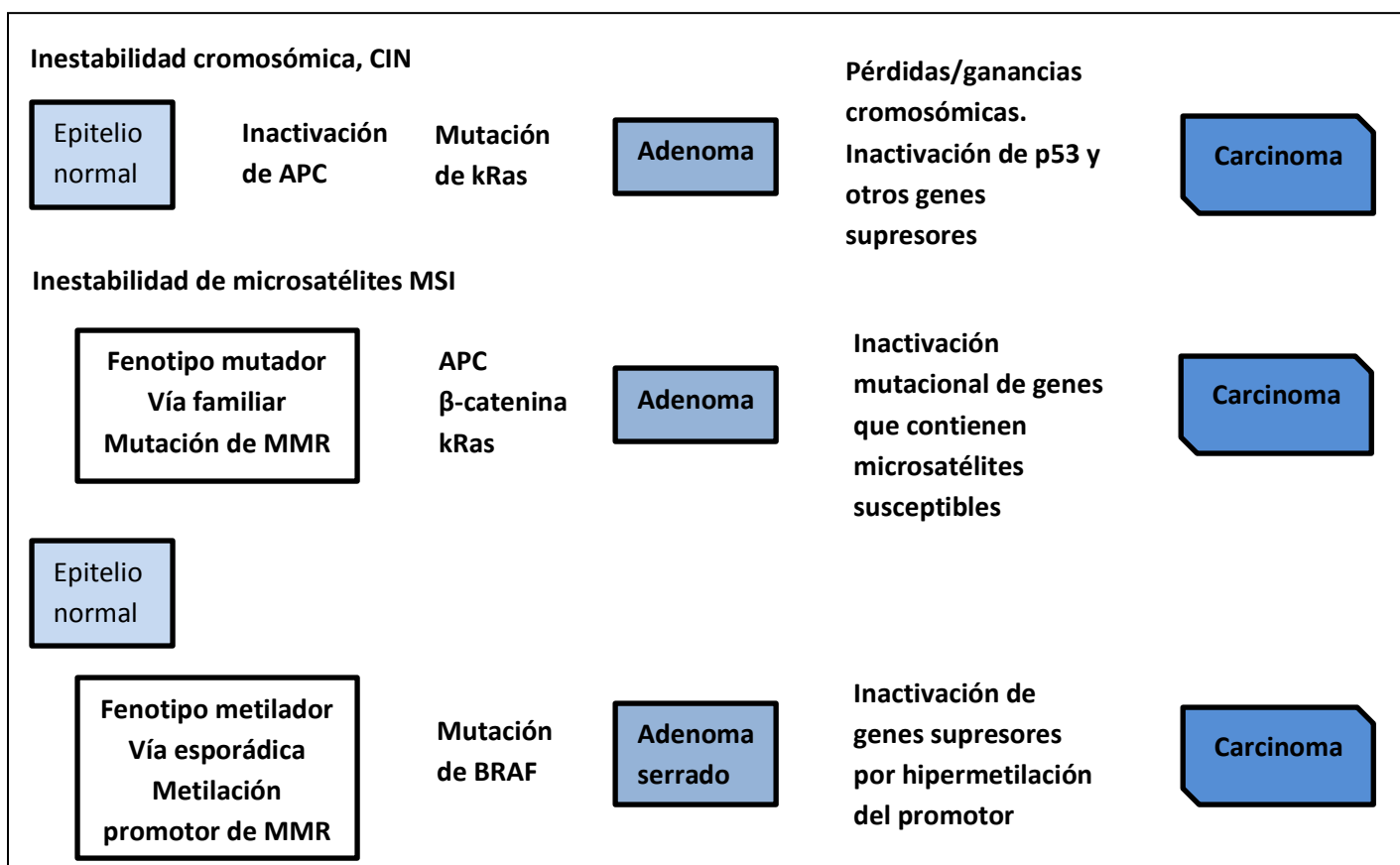


Figura 9. Vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal.  
Adaptado de Fonseca Sánchez E, 2018<sup>7</sup>.

### 3.2. Alteraciones moleculares específicas

En la tabla 1 se resúmen las principales mutaciones asociadas al cáncer colorrectal.

Síndrome/enfermedad	Gen responsable	Modo de adquisición
Poliposis adenomatosa familiar	APC	Línea germinal ( hereditario)
Cáncer colorrectal no polipósico hereditario (Síndrome de Lynch)	MMR	
	hMSH2	
	hMLH1	
	hPMS1	
	hPMS2	
	hMSH3	
	hMSH6	
Tumor esporádico	Genes supresores de tumores	Somático (adquirido)
	p53	
	DCC	
	APC	
	Oncogenes	
	myc	
	ras	
	src	
	erbB2	
	Genes MMR (cambio epigenético)	

Tabla 1. Mutaciones asociadas al cáncer colorrectal.

APC: adenomatous polyposis coli gene, gen de la poliposis adenomatosa; DCC: deleted in colorectal carcinoma gen, gen suprimido en el carcinoma colorrectal; MMR: mismatch repair gene, gen reparador del ADN. Adaptado de: Frucht H,2018<sup>28</sup>.

#### 3.2.1. Oncogenes

Entre los oncogenes implicados en el cáncer colorrectal esporádico están ras, src, c-myc y c-erbB-2 (HER2/neu)

El más importante de ellos es **ras**, que tiene 3 variantes: H-ras, K-ras y N-ras. Aunque cualquiera de los tres oncogenes cuando está mutado puede transformar las células normales, K-ras es el más frecuentemente mutado en el cáncer colorrectal. Ras se encuentra mutado en hasta un 50% de los casos esporádicos de CCR<sup>32</sup>.

### 3.2.2. Genes supresores de tumores

En el cáncer colorrectal se han identificado varios genes supresores, entre ellos APC, p53 y DCC.

El gen **APC**, en el cromosoma 5q, es quizá el más importante en el desarrollo inicial del cáncer colorrectal. Se observan mutaciones somáticas en los dos alelos de este gen en el 80% de los tumores colorrectales esporádicos y una única mutación germinal en este gen es responsable de la poliposis adenomatosa familiar (Figura 10).

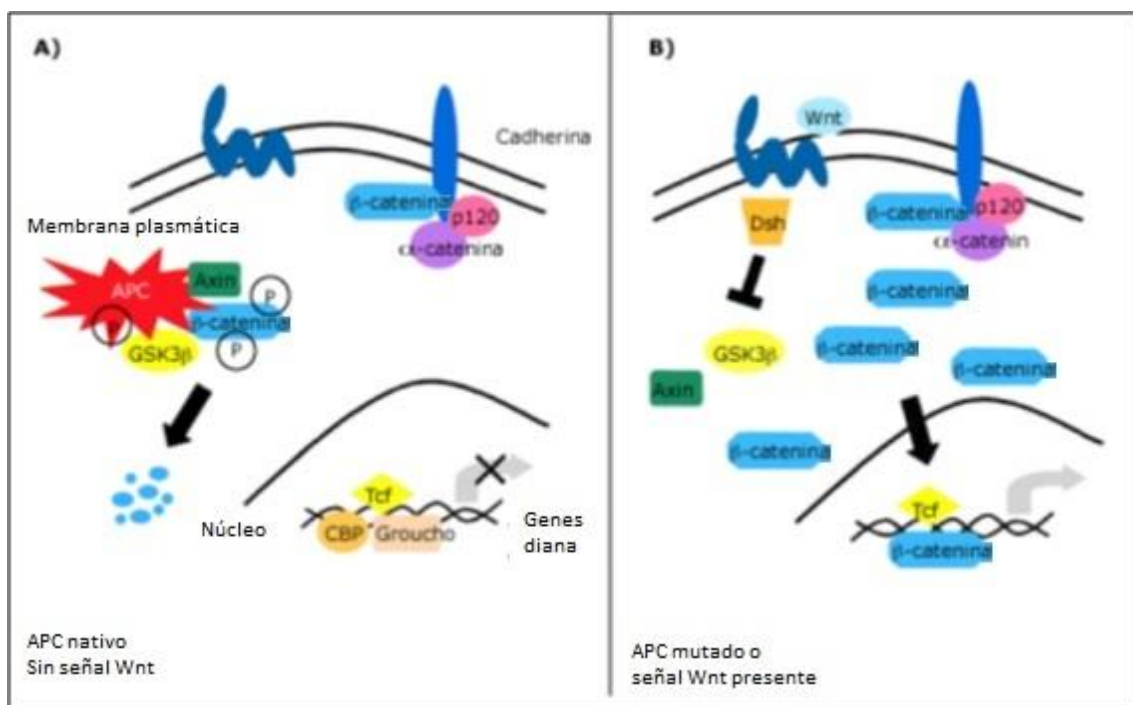


Figura 10. El gen APC y posibles mecanismos patogénicos. El gen APC modula la activación de  $\beta$ -catenina y Tcf (T-cell factor) y la transducción de señal Wnt (Wingless-type) (A) Cuando APC no está mutado o en ausencia del ligando Wnt,  $\beta$ -catenina se localiza en la uniones adherentes, donde se asocia con E-cadherina,  $\alpha$ -catenina, p120, e indirectamente con el citoesqueleto. GSK3 $\beta$  fosforila a  $\beta$ -catenina en un complejo que contiene  $\beta$ -catenina, APC, y miembros de la familia axin, y  $\beta$ -catenina es degradada rápidamente por ubiquitinación en el protosoma. (B) Cuando APC está mutado,  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y en el núcleo. De igual manera, la unión del ligando Wnt a su receptor, inactiva la kinasa GSK3 $\beta$  mediante Dsh (dishevelled), generando un pool citosólico de  $\beta$ -catenina.  $\beta$ -catenina se asocia a factores de la transcripción miembros de la familia Tcf y modula la transcripción de genes diana. El complejo  $\beta$ -catenina/Tcf actúa como un interruptor, controlando la proliferación vs la diferenciación en las células epiteliales de las criptas intestinales. La activación de esta vía evita la diferenciación celular e induce resistencia a la apoptosis. El resultado final es la proliferación celular. Adaptada de: Goss KH,2000<sup>33</sup>.

El gen **p53**, en el cromosoma 17p, es el más frecuentemente mutado en el cáncer humano. Debido a su papel principal en prevenir la proliferación de células con daño en el DNA, se le ha llamado “el guardián del genoma”. En un 50-70% de los cánceres colorrectales la inactivación de p53 sucede mediante mutación de un alelo seguida de pérdida del otro<sup>34</sup>.

En el cáncer colorrectal también se han identificado mutaciones puntuales en el gen **DDC**, en el cromosoma 18q. Estas mutaciones llevarían a pérdida de expresión de la proteína DDC, que parece participar en las interacciones célula-célula o célula-matriz<sup>35</sup>.

### 3.2.3. Genes reparadores

Los genes reparadores (MMR) son los responsables de corregir los errores en el apareamiento de bases y las pequeñas inserciones o deleciones que ocurren durante la replicación del ADN. Algunos de ellos son: hMSH2 (human mutS homolog 2), hMLH1 (human mutL homolog 1), hPMS1y hPMS2 (human postmeiotic segregation 1 y 2), hMSH6 (human mutS homolog 6) y hMLH3, un gen reparador que interacciona con MLH1<sup>36</sup>.

Las mutaciones germinales en uno de los genes reparadores son la alteración genética subyacente en la mayoría de las familias con Síndrome de Lynch. Además, se encuentra pérdida de expresión de estos genes en aproximadamente el 15% de los tumores colorrectales esporádicos. Sin embargo, los casos esporádicos con expresión deficiente de los genes MMR no presentan mutaciones sino cambios epigenéticos (por ejemplo hipermetilación de la región promotora) que silencian la expresión genética<sup>37</sup>.

## 4. HISTORIA NATURAL

Como se ha expuesto anteriormente, actualmente se conoce parte de la secuencia de oncogenes y genes supresores que intervienen en el desarrollo de este tumor, y que según el modelo de Vogelstein, se debería a una pérdida de genes supresores de tumores junto a la activación de oncogenes.



La mayoría de los cánceres de colon se desarrollan a partir de un adenoma, aunque algunos pueden aparecer *de novo*, sin existencia previa de una lesión adenomatosa. Una vez realizada la transición desde adenoma a carcinoma, éste desarrolla un crecimiento lento en sentido circular, con tendencia a estenotar la luz intestinal, y en profundidad hacia la pared intestinal y las estructuras vecinas<sup>38</sup>.

La diseminación locorregional suele ser ordenada, invadiendo primero los linfáticos, aunque es raro en tumores que no sobrepasan la submucosa, ya que se comienza a invadir a partir de los ganglios circunferenciales de la submucosa. Inicialmente afectan a los ganglios paracólicos y pararrectales, para luego extenderse a los mesentéricos. A partir de aquí, la diseminación depende de la localización primaria del tumor<sup>7</sup>:

- Cáncer de recto situado a menos de 3cm del margen anal: se disemina hacia los linfáticos inguinales.
- Cáncer de recto situado a 3-8cm del margen anal: se disemina hacia los ganglios linfáticos ilíacos internos.
- Cáncer de recto situado a más de 8 cm del margen anal: se disemina hacia los ganglios linfáticos mesentéricos superiores.
- Cáncer de colon: se disemina hacia los ganglios linfáticos mesentéricos superiores.

La diseminación hematógena se realiza desde las estaciones ganglionares afectadas. Así, desde los ganglios mesentéricos superiores la diseminación se hace a través de la vena mesentérica superior, a la vena porta y de ésta al hígado. Desde los ganglios ilíacos e inguinales, por la vena cava inferior, hasta el pulmón<sup>7</sup>.

La localización metastásica más frecuente es el hígado (60-70%), seguido del pulmón (25-40%). Menos frecuentes son las metástasis óseas (5-10%), ováricas (3-5%), suprarrenales (1%) o en SNC (1%)<sup>7,38</sup>.

En el momento del diagnóstico una cuarta parte de los pacientes presentan metástasis y solamente el 15% se diagnostica en un estadio precoz<sup>38</sup>.

## **5. ANATOMÍA PATOLÓGICA**

### **5.1. Localización**

Considerando en conjunto el cáncer colorrectal, las localizaciones más frecuentes son recto (45%) y sigma (25%)

Cuando se tiene en cuenta el colon de forma aislada, el orden de frecuencia, de mayor a menor, es: colon descendente, colon transverso y colon ascendente. Aunque existe una creciente progresión hacia áreas más proximales<sup>7</sup>.

### **5.2. Multiplicidad**

En el 3% de los casos de cáncer colorrectal se diagnostican tumores sincrónicos y en el 2% metacrónicos. Esto exige una correcta evaluación del colon antes de proceder al tratamiento. En la colitis ulcerosa y en el síndrome de poliposis familiar la frecuencia es mayor, pero estas patologías son poco frecuentes en la población general<sup>39</sup>.

### **5.3. Tipo histológico**

La gran mayoría de los tumores colorrectales son carcinomas y más del 90% de ellos son adenocarcinomas. El tubular o glandular es el más frecuente, aunque se describen otros subtipos de adenocarcinoma, como el mucinoso, el de células en anillo de sello o el medular. Otros tipos menos frecuentes de carcinoma son: carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células fusiformes y el carcinoma indiferenciado<sup>7,39</sup>.

También son infrecuentes otros tipos histológicos, como: tumores mesenquimales, linfomas, neoplasias neuroendocrinas, melanoma<sup>7,39</sup>.

## 5.4. Grado de diferenciación

Los adenocarcinomas pueden clasificarse según el grado histológico de diferenciación, que tiene en cuenta la proporción de glándulas bien formadas<sup>39,40</sup>.

- Si más del 95% del tumor está constituido por glándulas, se trata de un tumor bien diferenciado, grado 1.
- Si hay formación de glándulas en el 50-95% del tumor, es un tumor moderadamente diferenciado, grado 2
- Si la formación de glándulas no alcanza el 50%, se trata de un tumor pobremente diferenciado, grado 3.

La categoría de “tumor indiferenciado”, grado 4, se reserva para carcinomas sin formación glandular, ni producción de mucina, ni diferenciación neuroendocrina, ni escamosa ni sarcomatoide.

Los tumores grado 1 y 2 (bien diferenciado y moderadamente diferenciado) se suelen agrupar en lo que se denomina “bajo grado” y los tumores con menos del 50% de formación de glándulas (pobremente diferenciado e indiferenciado) son de “alto grado”

Los tumores con alta inestabilidad de microsatélites se consideran de bajo grado<sup>40</sup>.

## 5.5. Inmunohistoquímica

CK20 (*cytokeratin 20*) y CDX2 (*caudal-type homeobox 2*) son dos de los marcadores más sensibles y específicos de diferenciación intestinal y son muy útiles para identificar adenocarcinomas de origen colorrectal<sup>41,42</sup>.

La inmunohistoquímica también es útil para identificar la expresión deficiente de proteínas reparadoras (MMRs)<sup>43</sup>.

## 6. DIAGNÓSTICO

En la mayoría de los casos el cáncer colorrectal se diagnostica a partir de síntomas o debido a un sangrado oculto. El *screening* ha demostrado detectar casos en estadios más tempranos y mejorar la supervivencia<sup>38</sup>.

### 6.1. Manifestaciones clínicas

Los signos y síntomas de presentación varían según la localización de la lesión primaria y la presencia de metástasis.

#### 6.1.1. Manifestaciones locales

Los síntomas típicos son hematoquecia o melena, anemia ferropénica, dolor abdominal y cambios en el ritmo intestinal. Menos frecuentemente se presenta como obstrucción intestinal<sup>7,38</sup>.

Según la localización del tumor varían las manifestaciones clínicas:

- En las lesiones colónicas izquierdas: cambios en el ritmo intestinal, hematoquecia y obstrucción intestinal.
- En las lesiones colónicas derechas: masa abdominal (25%), síntomas o signos de anemia crónica (la hemorragia suele ser oculta) La obstrucción intestinal es rara y constituye un hecho tardío, ya que tiene un mayor calibre, su pared es más delgada y su contenido líquido.
- En las lesiones rectales: rectorragia (50%), disminución del calibre de las heces, cambios en el ritmo intestinal, defecación imperiosa y tenesmo.

#### 6.1.2. Manifestaciones sistémicas

Debidas a la presencia de metástasis a distancia y dependen de su localización. Por ejemplo: hepatomegalia dolorosa, clínica respiratoria, pérdida de peso, astenia, fiebre<sup>7,38</sup>.

#### 6.1.3. Síndromes paraneoplásicos

Son infrecuentes, pero pueden ser la manifestación de la enfermedad. Algunos asociados al cáncer colorrectal son: Miositis, dermatomiositis, acantosis nigricans e hipertrichosis lanuginosa<sup>7,38</sup>.

## 6.2. Exploración física

Muy útil para determinar el estado de nutrición del pacientes, detectar signos secundarios de anemia, masas abdominales, hepatomegalia, ascitis, signos de obstrucción intestinal, etc.

Se deben explorar las regiones inguinales, las fosas supraclaviculares y las axilas, para descartar la presencia de adenopatías.

El tacto rectal es fundamental, ya que permite descubrir la mayoría de los tumores rectales y observar las características del contenido fecal para descartar la existencia de sangre roja o melenas<sup>7,38</sup>.

## 6.3. Exámenes complementarios y estudio de extensión

### 6.3.1. Diagnóstico de naturaleza

- La **colonoscopia** permite la localización del tumor primario, evaluar la presencia de lesiones sincrónicas y la toma de biopsias, que nos permitirá el diagnóstico histológico.

### 6.3.2. Diagnóstico de extensión

- Una vez confirmado el diagnóstico de CCR, se debe realizar un estudio de extensión de la enfermedad: siguiendo las recomendaciones de las guías de práctica clínica, se suele realizar una **TC** (Tomografía Computarizada) tóraco-abdomino-pélvica.

- La **RM** (Resonancia Magnética) puede ser de utilidad en el cáncer de colon para definir lesiones hepáticas. En el cáncer de recto se utiliza la RM pélvica para definir la extensión locorregional.
- La **ecografía endorrectal** también puede ser útil para la estadificación local del cáncer de recto.
- La **PET** (Tomografía por Emisión de Positrones) puede estar indicada en pacientes que van a ser sometidos a cirugía de rescate con intención curativa, para descartar la existencia de enfermedad a otro nivel<sup>7</sup>.

### 6.3.3. Otros

- Marcadores tumorales: El **CEA** (Antígeno Carcinoembrionario) es una glucoproteína producida por tumores colorrectales, aunque también puede aparecer en otros tipos de tumores y en otras circunstancias, como en fumadores o en infecciones de las vías respiratorias. Se estima que su sensibilidad para el diagnóstico de cáncer colorrectal es sólo del 46% y su especificidad del 89%<sup>44</sup>. No se recomienda para diagnóstico. Puede ser útil en el seguimiento de los pacientes, ya que una elevación tras la resección del tumor o después de su normalización se asocia con la presencia de tumor<sup>45</sup>. Se ha discutido su utilidad pronóstica, ya que hay datos que sugieren que los pacientes con un CEA sérico >5 ng/mL tienen un peor pronóstico, estadio por estadio, que aquellos con niveles más bajos. Sin embargo, hay datos que sugieren que un CEA elevado en el preoperatorio que se normaliza tras la resección no es indicador de peor pronóstico<sup>46</sup>.

## 6.4. Estadios

La primera clasificación fue propuesta por Dukes en 1932, pero actualmente la más aceptada es la TNM (Tumor Node Metastases, Tabla 2).

**Tumor primario (T)**

Tx – Tumor primario no evaluable

T0 – No evidencia de tumor primario

Tis – Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia.

T1 – Tumor que invade la submucosa.

T2 – Tumor que invade la muscular propia

T3 – Tumor que penetra la muscular propia hasta el tejido pericólorrectal\*

T4a – Tumor que invade el peritoneo visceral\*,\*\*

T4b – Tumor que invade estructuras u órganos adyacentes\*,\*\*

**Ganglios linfáticos regionales (N)**

Nx – Ganglios linfáticos no evaluables

N0 – No metástasis a ganglios linfáticos regionales

N1 – Metástasis de uno a tres ganglios linfáticos regionales

N1a – Metástasis a un ganglio linfático regional

N1b – Metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales

N1c – Depósitos tumorales en la subserosa, mesenterio, o tejido no peritonizado pericólico o perirrectal, sin compromiso ganglionar regional.

N2 – Metástasis de cuatro o más ganglios linfáticos regionales

N2a – Metástasis de 4 a 6 ganglios linfáticos regionales

N2b – Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos regionales

**Metástasis a distancia (M)**

M0 – No metástasis a distancia

M1 – Metástasis a distancia

M1a – Metástasis confinada a un solo sitio u órgano sin metástasis peritoneales

M1b – Metástasis en más de un sitio u órgano sin metástasis peritoneales

M1c – Metástasis en la superficie peritoneal con o sin metástasis en otras localizaciones

**Estadios**

0 – Tis N0 M0

I – T1 N0 M0; T2 N0 M0

IIA – T3 N0 M0

IIB – T4a N0 M0

IIC – T4b N0 M0

IIIA – T1-T2 N1/N1c M0; T1 N2a M0

IIIB – T3-T4a N1/N1c M0; T2-T3 N2a M0; T1-T2 N2b M0

IIIC – T4a N2a M0; T3-T4a N2b M0; T4b N1-N2 M0

IVA – Cualquier T Cualquier N M1a

IVB – Cualquier T Cualquier N M1b

Cualquier T Cualquier N M1c

IVC–

\* Se utiliza las letras V y L para denotar la presencia o ausencia de compromiso vascular o linfático, respectivamente. De igual forma la presencia o ausencia de invasión perineural se establece con PN.

\*\* La invasión directa en T4 incluye el compromiso de otros órganos u otros segmentos del colon o recto como resultado de la extensión directa a través de la serosa y confirmada por patología. Para cánceres de ubicación retroperitoneal o subperitoneal, la invasión directa de otros órganos o estructuras por extensión más allá de la muscular propia como invasión de la pared posterior en colon descendente que comprometa el riñón izquierdo o la pared abdominal, o en cáncer de recto con invasión de la próstata, vesículas seminales, cervix o vagina. Si hay compromiso macroscópico de un órgano vecino se clasifica cT4b. Si en la patología NO se evidencia compromiso del órgano adyacente, se clasifica como pT1-T4a, según el caso

Tabla 2. Estadificación del cáncer colorectal. Adaptada de AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual, Eighth Edition (2017)<sup>47</sup>.

## 6.5. Cribado

La posibilidad de identificar una lesión premaligna bien definida (pólipo adenomatoso), asociada con el diagnóstico de la enfermedad en las primeras fases, hacen del cáncer colorrectal un candidato ideal para las pruebas de detección precoz.

No existe unanimidad en cuanto a los procedimientos a realizar. En general se recomienda hacer a partir de los 50 años examen físico general, tacto rectal, detección de sangre oculta en heces anual o bienal, y/o rectosigmoidoscopia cada 5 años y colonoscopia cada 10 años<sup>48-51</sup>. Esta periodicidad se modificará si es necesario según los resultados.

En individuos de alto riesgo, como antecedente de poliposis familiar o miembros de familias con cáncer colorrectal no polipósico (Síndrome de Lynch) deben realizarse de forma precoz y periódica en todos los miembros de la familia. En estas situaciones es recomendable realizar un adecuado consejo genético<sup>52</sup>.

## 7. FACTORES PRONÓSTICOS

La mayoría de ellos son anatómicos, si bien en los últimos años se han añadido marcadores biológicos.

El factor pronóstico más importante es la **extensión de la enfermedad** en el momento del diagnóstico. En la figura 11 se muestra la tasa de supervivencia a 5 años según el estadio tumoral al diagnóstico para pacientes con cáncer de colon de la base de datos SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) estratificados por estadios.

La principal herramienta para determinar el pronóstico tras una cirugía potencialmente curativa es el análisis patológico de la pieza resecada<sup>39</sup>.



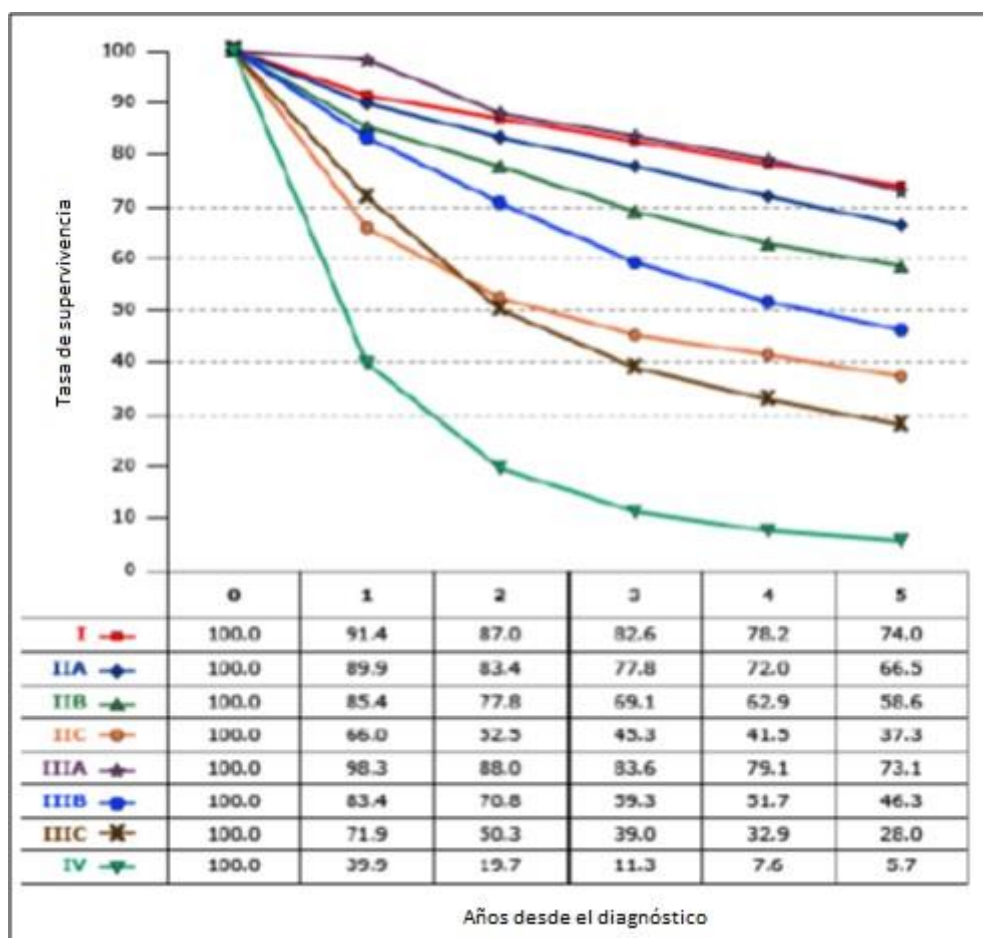


Figura 11. Tasas de supervivencia por estadios. Tasas de supervivencia observadas para 28.491 casos de adenocarcinoma de colon. Datos tomados de: SEER 1973-2005 Public Use File, diagnosticados en los años 1998-2000. El estadio I incluye 7417 casos, el estadio IIA 9956, el estadio IIB 997, el estadio IIC 725, el estadio IIIA 868, el estadio IIIB 1492, el estadio IIIC 2000 y el estadio IV 5036.

Aunque los parámetros que determinan el estadio patológico son los mayores predictores de la evolución tras la cirugía, hay otras características histológicas, clínicas y moleculares que pueden influir en el pronóstico, independientemente del estadio<sup>39</sup>.

## 7.1. Factores patológicos

Las características patológicas más importantes son<sup>7,39</sup>:

- La presencia de metástasis a distancia
- La afectación ganglionar, en especial el número de ganglios afectados

- El número de ganglios en la pieza quirúrgica (deben ser al menos 12)
- La extensión tumoral local
- El grado histológico
- Invasión linfovascular y perineural
- La configuración del borde tumoral
- Tumor residual tras la exéresis quirúrgica
- Para pacientes con cáncer de recto tratados con neoadyuvancia, el grado de regresión tumoral.

## 7.2. Factores clínicos

- Obstrucción y/o perforación intestinal
- Localización: Peor pronóstico en el colon derecho (en posible relación con la biología molecular)<sup>54</sup>.
- CEA preoperatorio elevado (>5ng/dL): Varios estudios corroboran su impacto en la supervivencia, independientemente del estadio, y se recomienda recoger su valor como factor pronóstico, aunque actualmente no se utilice para decisión terapéutica (hace unos años sí se consideraba a la hora de plantear el tratamiento adyuvante)<sup>55-58</sup>. Como ya se ha comentado previamente, los resultados de los estudios son controvertidos, ya que según otros autores no se corrobora el valor pronóstico el CEA preoperatorio en los estadios localizados con resección completa y normalización posterior del CEA<sup>46</sup>.

## 7.3. Factores moleculares

A pesar del gran número de estudios explorando la implicación pronóstica de varios factores moleculares, el que tiene más importancia para la toma de decisiones en la práctica clínica actualmente es el **estado de las proteínas reparadoras del ADN (*MMR proteins*)** ya que su deficiencia se ha asociado a un mejor pronóstico en pacientes con estadio localizado. Además, es un factor

predictivo de ausencia de beneficio del tratamiento adyuvante sólo con fluoropirimidinas <sup>7,39</sup>.

Las **mutaciones de RAS** se usan por su valor predictivo de ausencia de eficacia para los agentes anti-EGFR<sup>39</sup>.

Las **mutaciones activadoras de BRAF** tienen utilidad como factor pronóstico y predictivo: Confieren peor pronóstico en los pacientes que no tienen inestabilidad de microsatélites. Además, hay datos que sugieren que estas mutaciones confieren resistencia a los fármacos anti-EGFR<sup>39</sup>.

## 8. TRATAMIENTO

### 8.1. Modalidades terapéuticas

#### 8.1.1. Cirugía

La cirugía continúa siendo el pilar básico del tratamiento colorrectal. Su objetivo es reseccionar en bloque el segmento intestinal con adecuados márgenes, incluyendo el tumor y la grasa locorregional, que alberga a los ganglios linfáticos de drenaje<sup>7</sup>.

##### 8.1.1.1. *Cirugía radical*

Aproximadamente en el 80% de los casos el cáncer de colon tiene afectación local o locorregional, sin metástasis a distancia. La resección quirúrgica es el único tratamiento curativo de esta enfermedad. Los tipos de cirugía más frecuentes son hemicolectomías o colectomías segmentarias con reanastomosis primaria del colon; ocasionalmente precisan colostomía o ileostomía temporal para evitar complicaciones de la sutura, que serán reconstruidas con posterioridad<sup>7</sup>.

En la localización rectal el procedimiento quirúrgico más adecuado dependerá de la distancia del tumor al margen anal:

- En lesiones del tercio superior y medio: resección anterior baja

- En lesiones del tercio inferior: resección anterior si el margen superior es superior a 2 cm; en caso contrario se realizará amputación abdominoperineal con colostomía definitiva.

En el cáncer de recto situado por debajo del promontorio debe realizarse una exéresis completa de la fascia mesorrectal<sup>7,59,60</sup>.

En cuanto al análisis ganglionar, se recomienda que en la pieza operatoria se incluyan al menos 12 ganglios para poder realizar una correcta estadificación<sup>7,59,60</sup>.

#### **8.1.1.2. Cirugía paliativa**

Indicada para aliviar los síntomas causados por el tumor, como obstrucción o hemorragia. En algunos casos de obstrucción intestinal la cirugía puede evitarse con la colocación de *stent*.

#### **8.1.1.3. Cirugía sobre la enfermedad localmente avanzada o recidiva local**

La presencia de un tumor localmente avanzado o recurrente no impide su resección, aunque esta cirugía puede requerir procedimientos más radicales.

Las recidivas locales son más frecuentes en el cáncer rectal y sobre las anastomosis<sup>7</sup>.

#### **8.1.1.4. Cirugía sobre la enfermedad metastásica**

La cirugía supone una opción curativa para pacientes seleccionados con enfermedad metastásica limitada, especialmente en el hígado o en el pulmón. También en algunos casos de afectación peritoneal. Con la metastasectomía, junto con la resección del tumor primario y el tratamiento sistémico, se consiguen largos supervivientes hasta en el 50% de los casos. Sin embargo, incluso tras una resección completa de las metástasis, la mayoría de los pacientes que están vivos a los 5 años tienen enfermedad; sólo el 20-30% permanecen libres de recidiva a largo plazo y pueden estar curados<sup>7,61</sup>.

En el caso de las metástasis hepáticas, los criterios de selección de los pacientes han ido evolucionando y actualmente se recomienda valorar la cirugía para todos los pacientes operables que presenten únicamente metástasis hepáticas, excepto en los siguientes casos<sup>61</sup>:

- Si hay evidencia radiológica de afectación de la arteria hepática común, el conducto hepático común o biliar común, o de la vena porta
- Infiltración hepática extensa (>70%, más de 6 segmentos o afectación de las tres venas hepáticas)
- Predicción de reserva funcional hepática inadecuada tras la resección.

Si las metástasis hepáticas son resecables de inicio, una opción es realizar primero la cirugía, sobre todo si se trata de pacientes con  $\leq 4$  lesiones o si éstas están en el mismo lóbulo. Para pacientes con >4 metástasis, afectación bilobar o sospecha de afectación ganglionar portal, se recomienda administrar primero quimioterapia y después reevaluación quirúrgica<sup>59,61</sup>.

Otros autores recomiendan empezar con quimioterapia en todos los pacientes con metástasis hepáticas resecables, en parte para seleccionar aquellos que más se pueden beneficiar de la resección<sup>62</sup>.

Si se decide empezar por la quimioterapia, se debe minimizar el número de ciclos, con controles radiológicos cada 6 semanas y planificación de la cirugía en cuanto las metástasis sean claramente resecables<sup>59-61</sup>.

No hay un régimen de quimioterapia establecido, considerándose adecuadas varias opciones de poliquimioterapia, combinadas o no con fármacos biológicos, según el perfil clínico y biológico del paciente y su tumor.

En los pacientes que presentan inicialmente metástasis hepáticas claramente irresecables, empezar con tratamiento quimioterápico es lo adecuado, teniendo en cuenta que la probabilidad de que la enfermedad se convierta en resecable es sólo de un 10-15%. Además, la duración prolongada de la quimioterapia preoperatoria en estos pacientes eleva el riesgo de toxicidad hepática y complicaciones postquirúrgicas<sup>59-61</sup>.

Se desconoce cuál es la mejor estrategia tras la resección completa de las metástasis hepáticas, pero en ausencia de estudios randomizados, se recomienda completar 6 meses de tratamiento quimioterápico, con un esquema que contenga oxaliplatino y fluoropirimidina<sup>59-61</sup>.

En el caso de las metástasis pulmonares, existe beneficio con la cirugía si se puede realizar una resección completa de todas las lesiones, con una reserva funcional pulmonar adecuada. Además, la enfermedad extrapulmonar debe estar controlada, incluyendo resección del tumor primario o de otras metástasis extrapulmonares<sup>59</sup>.

Otra opción de resección quirúrgica en la enfermedad diseminada es la peritonectomía en presencia de carcinomatosis peritoneal sin otra diseminación asociada (en pacientes que cumplan determinados criterios)<sup>7</sup>.

La mejora de las técnicas quirúrgicas y el empleo de esquemas de poliquimioterapia neoadyuvante, combinados con fármacos biológicos, consiguen hacer factible la cirugía cada vez en más pacientes.

### **8.1.2. Radioterapia**

#### **8.1.2.1. *Adyuvante y neoadyuvante***

En el cáncer de recto disminuye la tasa de recidiva e incrementa la supervivencia en combinación con quimioterapia. La modalidad de tratamiento neoadyuvante ofrece las siguientes ventajas: al irradiarse tejidos no dañados por la cirugía mejora el rendimiento del tratamiento y disminuye su toxicidad, además de aumentar la tasa de resecabilidad. En términos de control local y supervivencia ambas modalidades, adyuvante y neoadyuvante, son similares<sup>7,59,60</sup>.

Su empleo en el cáncer de colon está limitado por la movilidad del mismo y la toxicidad que se produciría con dosis potencialmente curativas, por lo que actualmente la radioterapia no forma parte del tratamiento estándar<sup>7,59,60</sup>.

### 8.1.2.2. *Paliativa*

Se puede emplear para tratar el dolor de las metástasis óseas, para prevenir una compresión medular o sobre una recurrencia local irresecable, para paliar el dolor, el sangrado y disminuir sus posibles complicaciones.

### 8.1.3. Tratamiento sistémico

#### 8.1.3.1. *Como tratamiento primario en enfermedad avanzada*

Aproximadamente un 20% de los pacientes con cáncer de colon van a tener metástasis en el momento del diagnóstico. A pesar de los avances en el tratamiento sistémico, que han conseguido aumentar la supervivencia a más de 24 meses, menos del 10% de los pacientes tratados sólo con quimioterapia están vivos a los 5 años y prácticamente ninguno está libre de enfermedad a no ser que se realice resección o ablación de las metástasis<sup>63</sup>.

Uno de los objetivos del tratamiento sistémico, de poliquimioterapia asociada a los nuevos fármacos biológicos, es conseguir hacer resecable la enfermedad metastásica, ya que el enfermo puede tener una opción de curación. Aproximadamente un tercio de los pacientes con metástasis resecadas presentan supervivencias prolongadas<sup>63</sup>.

Sin embargo, la mayoría de los pacientes en estadio avanzado no van a ser candidatos a resección de las metástasis. En ellos la finalidad del tratamiento quimioterápico es incrementar la supervivencia libre de progresión, la supervivencia global y mejorar su calidad de vida.

Los **quimioterápicos** más empleados en cáncer colorrectal son<sup>7,59,60</sup>:

- **5-fluorouracilo (5-FU):** El más empleado desde la década de los 60. Se emplea en combinación con ácido folínico. La tasa de respuestas suele ser mayor cuando se emplea en perfusión continua que cuando se hace en bolus. Actualmente se suele utilizar junto a otros fármacos, como oxaliplatino e irinotecan.

- **Fluoropirimidinas orales:** Tegafur, tegafur/uracilo, capecitabina, S-1. Su eficacia es similar al 5-FU, con la peculiaridad de poder ser administradas vía oral. En la actualidad el más empleado y que cuenta con mayor evidencia científica en cuanto a eficacia es la capecitabina, que puede utilizarse en monoterapia o asociada a otros fármacos.
- **Oxaliplatino:** Análogo del cisplatino. Consigue tasas de respuestas en combinación con fluoropirimidinas superiores al 50%. Produce neurotoxicidad aguda con el frío y neurotoxicidad acumulativa que dificulta su uso prolongado.
- **Irinotecan:** Inhibidor de la topoisomerasa I. Sus tasas de respuesta son similares a las del anterior. La toxicidad más característica es un síndrome colinérgico agudo, que precisa atropina para su control. La diarrea tardía es el efecto secundario no hematológico más frecuente, especialmente cuando se combina con fluoropirimidinas.
- **Raltitrexed:** Inhibidor de la timidilato sintetasa. Uso poco frecuente en la actualidad. Es una opción de tratamiento en monoterapia tras fracaso a otras líneas previas o en combinación con oxaliplatino en pacientes con contraindicación para las fluoropirimidinas.
- **TAS 102 (trifluridina-tipiracilo):** Antimetabolito compuesto por un análogo de la timidina y un inhibidor de la timidina fosforilasa. Ha demostrado eficacia en CCR metastásico previamente tratado. Su principal toxicidad es la hematológica.

Se han identificado dianas moleculares en el tejido tumoral que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica. El objetivo de estos tratamientos es la interrupción de vías moleculares que intervienen en el crecimiento, la capacidad de metastatizar y la supervivencia de las células tumorales. Disponemos de dos grupos de fármacos de este tipo<sup>7,59,60</sup>:

- **Antiangiogénicos:**
  - **Bevacizumab:** Es un anticuerpo humanizado frente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) Aunque presenta actividad en monoterapia, son mejores los resultados con poliquimioterapia. Sus efectos secundarios más destacados son proteinuria, sangrado y fenómenos tromboembólicos arteriales.



- **Aflibercept:** Una proteína de fusión recombinante que consta de porciones de los dominios extracelulares de los receptores 1 y 2 del VEGF humano fusionados con la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Actúa como un receptor anzuelo soluble que impide la unión intra y extravascular de VEGF-A, VEGF-B y el factor de crecimiento placentario (PIGF) a sus receptores naturales. Eficaz en combinación en 2ª línea de tratamiento, tras progresión a tratamiento que contenga oxaliplatino. Su toxicidad principal: hipertensión arterial, sangrado y fenómenos tromboembólicos.
  - **Regorafenib:** Inhibidor de varias proteinquinasas, incluidas las implicadas en la angiogénesis tumoral (VEGFR-1, 2 y 3) y otras implicadas en la oncogénesis y el microambiente tumoral. Activo en CCR metastásico previamente tratado con los fármacos disponibles. Su toxicidad más frecuente es: astenia, cutánea (síndrome mano-pie), hipertensión arterial y alteraciones digestivas.
  - **Ramucirumab:** Anticuerpo monoclonal inhibidor del receptor 2 del VEGF. Indicado en 2ª línea de CCR metastásico en combinación con irinotecan y 5-FU, tras fallo a tratamiento previo con bevacizumab, oxaliplatino y fluoropirimidina. La toxicidad principal es la astenia, la digestiva y la relacionada con su acción antiangiogénica (hipertensión, sangrado, fenómenos tromboembólicos)
- **Anticuerpos frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR):**
- Cetuximab**, el primero en desarrollarse, es un anticuerpo monoclonal quimérico y **panitumumab** es un anticuerpo monoclonal humanizado. Ambos están indicados en pacientes que presentan el gen *RAS* nativo. Tienen actividad en monoterapia, pero especialmente en combinación con quimioterapia. Los efectos secundarios más relevantes son las reacciones de hipersensibilidad durante la infusión (en el caso del

cetuximab) y los cutáneos, ya que producen una erupción acneiforme característica.

La integración de los fármacos biológicos con la quimioterapia y su uso secuencial ha conseguido que la supervivencia de los pacientes con cáncer de colon metastásico pueda superar los 2 años. En primera línea de tratamiento se suelen emplear esquemas de poliquimioterapia basados en oxaliplatino o irinotecan, junto con una fluoropirimidina, y asociados a un fármaco biológico (antiangiogénico o anticuerpo frente a EGFR) en función de las características del paciente. A la progresión de la enfermedad, si el estado general del paciente lo permite, recibirán posteriores líneas de tratamiento con aquellos fármacos no administrados previamente. Lo importante para poder incrementar la supervivencia es poder emplear múltiples fármacos activos y no tanto el orden de uso<sup>7,59,60</sup>.

La **inmunoterapia** se ha incorporado recientemente al escenario del tratamiento sistémico del CCR. **Pembrolizumab**, un anticuerpo anti-PD-1, ha demostrado eficacia en el subtipo que presenta inestabilidad microsatélites. La toxicidad más característica de estos fármacos es la inmunorrelacionada (hipotiroidismo, diarrea, neumonitis...)<sup>7</sup>.

#### **8.1.3.2. Adyuvante**

En los pacientes que han sido operados con intención curativa, el objetivo de la quimioterapia complementaria es erradicar las micrometástasis, reduciendo la probabilidad de recidiva y aumentando la tasa de curación.

Su beneficio está claramente establecido en pacientes con ganglios positivos (estadio III) en los que disminuye las recaídas un 30% y la mortalidad un 22-32%<sup>7,63</sup>.

Sin embargo su beneficio no es tan claro en pacientes con estadio II. Los datos disponibles de estudios randomizados y metaanálisis indican que si hay beneficio de la quimioterapia basada en 5-FU en los pacientes con estadio II resecado, éste no supera el 5% de mejoría en la supervivencia a 5 años<sup>64,65</sup>.

Por este motivo, en estos pacientes la decisión se ha de realizar de forma individualizada. Las guías de práctica clínica recomiendan la quimioterapia adyuvante en estadios II en los pacientes con factores de alto riesgo, como son: tumores T4, oclusión y/o perforación intestinal, alto grado (3-4), invasión linfovascular o perineural, inadecuado número de ganglios analizados (<12)<sup>7,59,60</sup>.

Este tratamiento debe iniciarse lo antes posible, sin retrasar su comienzo más de 8 semanas<sup>7,59,60</sup>.

En cuanto al esquema de quimioterapia, en estadios III el combinar oxaliplatino con una fluoropirimidina ha demostrado beneficio en supervivencia en ensayos randomizados. Uno de los estudios fundamentales en este contexto ha sido el estudio MOSAIC, que comparó un esquema de poliquimioterapia basado en oxaliplatino junto con 5-FU en infusión y leucovorín (FOLFOX) frente al esquema clásico, 5-FU más ácido folínico, durante 6 meses. En él el esquema FOLFOX demostró beneficio en supervivencia libre de progresión y pasó a ser considerado el estándar<sup>66,67</sup>.

También son válidas modificaciones de este esquema en el que el 5-FU es sustituido por capecitabina (XELOX o CAPOX)<sup>68</sup>.

Otra opción terapéutica, sobre todo en ancianos o en pacientes con comorbilidad importante, puede ser la capecitabina en monoterapia, que es equivalente al esquema clásico de 5-FU más ácido folínico, con la ventaja de la administración oral<sup>7,59,60</sup>.

En estadios II no está claro cuál es el esquema de quimioterapia más apropiado, ya que aunque el estudio MOSAIC incluyó pacientes en estadio II y III, el beneficio en supervivencia libre de progresión parecía limitado al estadio III. En un análisis exploratorio en el subgrupo de pacientes con estadio II de alto riesgo sí parecía haber beneficio para FOLFOX, pero no fue estadísticamente significativo<sup>67</sup>. Como ocurre con el 5-FU, el beneficio que puede ofrecer el oxaliplatino es estos pacientes, de existir, es pequeño. Algunos oncólogos suelen utilizar en estos pacientes un régimen con 5-FU más leucovorin, considerando un esquema tipo FOLFOX para los pacientes con

varios factores de alto riesgo. También es razonable utilizar un esquema con oxaliplatino en los pacientes con tumores estadio II de alto riesgo con inestabilidad de microsatélites. En cuanto a la capecitabina, no hay datos sobre su beneficio en pacientes con estadio II, pero las guías de práctica clínica la consideran una alternativa válida (salvo en inestabilidad de microsatélites)<sup>59</sup>.

## 8.2. Tratamiento por estadios

En siguiente figura se resume el manejo terapéutico del carcinoma colorrectal según la estadificación de la enfermedad.

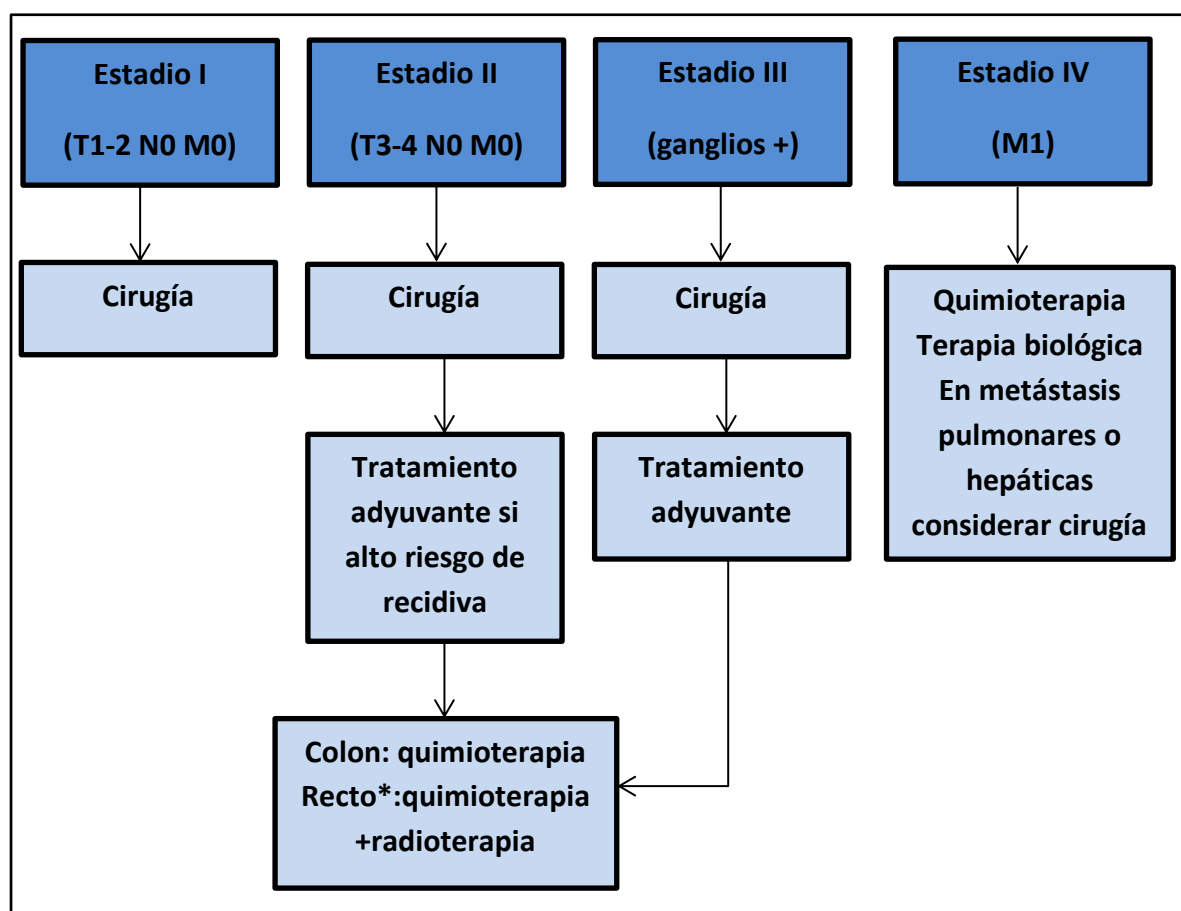


Figura 12. Tratamiento del cáncer de colon y recto por estadios. Adaptado de: Fonseca Sánchez E., 2018. \*En el cáncer de recto, considerar neoadyuvancia.

### **8.2.1. Estadio I (T1-2 N0 M0)**

El tratamiento estándar es la resección quirúrgica.

### **8.2.2. Estadio II (T3-4 N0 M0)**

Además del tratamiento quirúrgico, se debe considerar la adyuvancia con quimioterapia en los pacientes con factores de alto riesgo (T4, oclusión/perforación intestinal, alto grado, invasión linfovascular o perineural, número de ganglios analizados <12)

En los pacientes con inestabilidad de microsatélites no se recomienda el tratamiento adyuvante con quimioterapia, ya que presentan mejor pronóstico y resistencia al tratamiento con fluoropirimidinas.

En el caso de la localización rectal se recomienda además radioterapia adyuvante a partir del estadio T3 N0 M0.

### **8.2.3. Estadio III (ganglios positivos)**

En estos pacientes la quimioterapia adyuvante, así como radioterapia adyuvante en el caso de los tumores rectales, supone un claro beneficio en términos de control local y supervivencia.

Otra opción de tratamiento en el caso de los tumores rectales es la neoadyuvancia con quimio-radioterapia, seguida de cirugía y posterior quimioterapia adyuvante.

### **8.2.4. Estadio IV (M1)**

Como ya se ha expuesto previamente, en algunos de estos pacientes se debe considerar la resección de las metástasis con finalidad curativa. Sin embargo, en general el tratamiento en este estadio de la enfermedad es sistémico.

En cuanto a los esquemas terapéuticos a emplear, es importante tener en cuenta lo siguiente<sup>7,59,60</sup>:

- Con combinaciones de fármacos se logran mejores resultados que con monoterapia, siempre que el estado general del paciente lo permita.

- El tratamiento de elección en primera línea es una combinación de 5-FU en infusión continua o una fluoropirimidina oral, con oxaliplatino o irinotecan, más uno de los fármacos biológicos. En líneas sucesivas de tratamiento se emplearán aquellos fármacos o combinaciones que no se hayan utilizado previamente.

## 9. SEGUIMIENTO

Tras finalizar el tratamiento en los estadios II y III, se deben realizar controles periódicos para detectar precozmente las posibles recidivas locorregionales o metástasis. No hay un acuerdo unánime sobre cómo llevarlo a cabo, pero en general se recomiendan controles trimestrales hasta el tercer año, semestrales del 3º al 5º año y anuales posteriormente <sup>59</sup>.

Se recomienda realizar en cada visita una correcta anamnesis, exploración física y analítica general con determinación de CEA <sup>7,59,60</sup>.

La endoscopia debe realizarse a los 3-6 meses de la intervención si no fue completa al diagnóstico, mientras que si fue completa al diagnóstico se realizará al año; la siguiente se hará a los 3 años y luego cada 5 años, si no hay hallazgos relevantes. En caso de que se detecten pólipos, se deben extirpar y se trata de un adenoma avanzado (pólipo vellosos, >1cm o con displasia severa) se realizará otra colonoscopia en un año, mientras que si se trata de un adenoma sin esos criterios de riesgo se programará la siguiente colonoscopia en 3 años <sup>7,59,60</sup>.

En cuanto a la realización de TC, se debe realizar al menos con periodicidad anual en los pacientes con cáncer de recto o con cáncer de colon de alto riesgo, además de siempre que exista sospecha de recidiva <sup>7,59,60</sup>.

## 10. ETAPAS DE LA PROGRESIÓN METASTÁSICA, IMPLICACIÓN DE E-CADHERINA Y *SLUG*

Las células cancerosas presentan un crecimiento incontrolado, tienen capacidad de difundir (invadir los tejidos vecinos y dar lugar a metástasis) y pérdida de la diferenciación<sup>69</sup>.

Las metástasis son responsables de la mayoría de fracasos de los tratamientos y de los fallecimientos de los pacientes oncológicos. Muchas neoplasias presentan desde el momento de su detección depósitos secundarios ocultos (micrometástasis) o metástasis detectables clínicamente<sup>69,70</sup>.

El proceso metastático puede dividirse en diversas etapas secuenciales, como son: Crecimiento tumoral, angiogénesis, invasión local e intravasación, transporte e interacción, adhesión, extravasación y migración, y metástasis<sup>70,71</sup> (Figura 13).

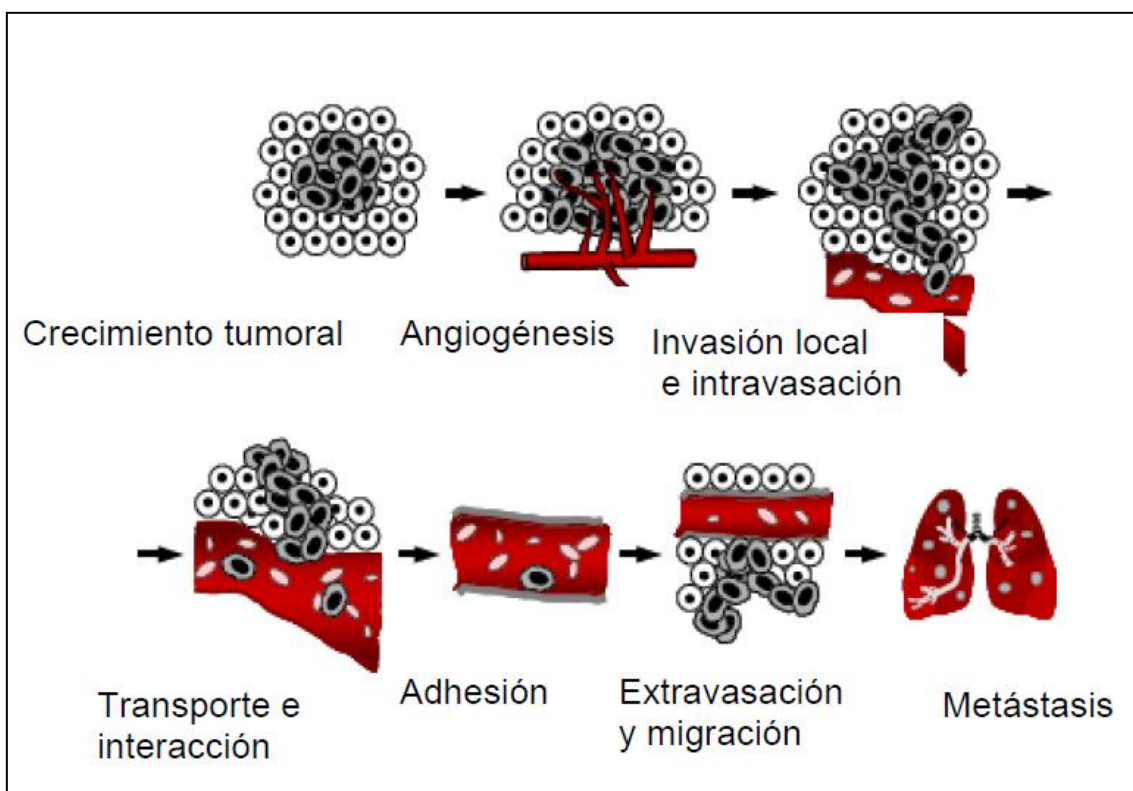


Figura 13. Etapas de la progresión metastásica. De: Del Barco E, 2006<sup>72</sup>. Adaptado de Welch DR and Rinker-Schaeffer CW, 1999<sup>70</sup>.

## 10.1. Crecimiento tumoral

El tumor representa una población celular en expansión, caracterizada por una ausencia o déficit de la sensibilidad al control de la multiplicación o una pérdida de sensibilidad a las órdenes de apoptosis (muerte celular programada).

Dentro de la cinética tumoral, tienen un papel importante las células madre<sup>69</sup>.

### 10.1.1. Células madre cancerígenas (*cancer stem cells*)

Hace años, se consideraba que había distintas poblaciones tumorales desde el punto de vista cinético, los denominados compartimentos celulares tumorales: A) compuesto por células en reproducción; B) células en reposo transitorio y que dependiendo de diferentes estímulos podían volver a reproducirse; y C) grupo de células que ya habían perdido su capacidad de reproducción. Según este modelo, estocástico, cualquier tipo de célula podría iniciar un tumor y era el conjunto de células similares quien lo mantenía y daba lugar a las metástasis (todas tendrían las mismas capacidades)<sup>69</sup>.

Este modelo no explicaba muy bien por qué solo una pequeña población celular era capaz de reproducir un tumor en ratones, cómo se producían las recaídas tardías de los tumores después de teóricas respuestas completas, por qué un tumor que se originaba en un tejido concreto era capaz de desarrollar otras estirpes celulares, cómo sólo un pequeño grupo de células se hacían o eran resistentes a tratamientos con quimioterapia o radioterapia, o cómo se acumulaban los daños genéticos en una célula somática a lo largo de los años para acabar produciendo un cáncer<sup>69</sup>.

El descubrimiento de las células madre hematopoyéticas por Till y McCulloch en los años 60, abrió un nuevo campo de la fisiología de los tejidos<sup>73</sup>.

Las células madre de cualquier tejido, en la edad adulta, son un grupo de células que tienen como función mantener, recambiar y renovar ese tejido a



lo largo de toda la vida. Estas células tienen una serie de propiedades que las diferencian de otras del mismo tejido<sup>74,75</sup>:

- **Capacidad de autorrenovación:** Se pueden dividir múltiples veces sin perder su indiferenciación. Tiene un tipo especial de división que se denomina asimétrica y permite conservar sus cromosomas intactos y ser capaces de dar lugar a células hijas diferentes que se especializarían. También se pueden dividir de forma simétrica, dando lugar a otras células madre.
- **Potencia ilimitada:** Capacidad para diferenciarse y especializarse en cualquier tipo de célula. Pueden ser totipotenciales, pluripotenciales o multipotenciales, según sean capaces de dar lugar a un individuo completo, a células de las tres hojas blastodérmicas, o a células de una sola hoja blastodérmica. Aunque hay excepciones, lo normal es que las células madre de tejidos adultos sean multipotenciales.
- **Mantenerse como células indiferenciadas:** Las células madre del adulto están en nichos especiales de los diferentes órganos, sometidos a una serie de señales especiales que les indican cuándo y cuánto tienen que reproducirse para mantener la homeostasis del tejido u órgano correspondiente.

Las células madre tienen una serie de características genéticas distintas, como los **genes implicados en la transición epitelio mesénquima (familia *SNAIL*)** que permiten adquirir capacidades migratorias<sup>76</sup>, o genes que les permiten ser más longevas y resistentes, como genes antiapoptóticos (*bcl 2*)<sup>77</sup> o de resistencia a drogas (*MDR*)<sup>78</sup>.

Se han identificado células madre en muchos tejidos, no sólo en los hematopoyéticos<sup>77</sup>.

A partir de estos hallazgos, se ha planteado que el origen de los tumores sea por alteraciones genéticas en las células madre de los diferentes tejidos del adulto. Estas células, por diferentes eventos en sus genes, perderían su control sobre la renovación y homeostasis de los tejidos y surgiría el tumor correspondiente. Estas células serían las responsables de mantener el tumor y

también de las metástasis y las recaídas. Teniendo en cuenta sus características, se explicaría por qué sólo un pequeño porcentaje de células es capaz de reproducir el tumor, por qué sólo unas pocas células son capaces de metastatizar, por qué son resistentes a tratamientos y hay recaídas tardías después de respuestas completas clínicas o por qué los eventos genéticos ocurridos hace años pueden ser responsables de tumores concretos. Esta es la teoría jerárquica del origen de los tumores<sup>69</sup>.

Se han identificado células madre tumorales no sólo en neoplasias hematopoyéticas, sino también en tumores de mama, cerebro, hígado, páncreas, pulmón, piel o colon<sup>77</sup>.

Estudios más recientes ponen en duda que esta teoría sea válida para todos los tumores, pues explicaría mal la evidencia de que en los tumores sucede un proceso aleatorio de cambios genéticos y de ventajas selectivas de clones determinados.

De todas formas, los dos modelos pueden ser compatibles con la idea de un grupo de células con características de células madre que mantienen el tumor. En la teoría jerárquica el primer evento carcinógeno sería siempre en el grupo de células madre y en el modelo estocástico el evento sucedería en cualquier célula y la haría adquirir características de célula madre<sup>69</sup>.

Hoy se postula la idea de evolución clonal de las células cancerosas, incluidas las células madre. Esta teoría mantiene que aparecen nuevos clones por cambios genéticos o epigenéticos de las células tumorales como consecuencia de las presiones ambientales, en un intento de adaptación al ambiente. Estas adaptaciones pueden cambiar la proliferación, el potencial metastásico o la resistencia a los fármacos, por ejemplo. También es posible que la evolución podría generar clones nuevos con potencial de auto-renovación. Esta teoría podría compatibilizar ambos modelos, como se ha comentado anteriormente<sup>69,79</sup>.

## 10.2. Angiogénesis

La angiogénesis, también llamada neovascularización o formación de nuevos vasos sanguíneos, es fundamental para el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, como ya postuló Judah Folkman en 1971<sup>80</sup>. Este fenómeno impide que las células tumorales mueran por falta de nutrientes y oxígeno y acúmulo de productos tóxicos<sup>81</sup>.

La activación angiogénica surge cuando se pierde el equilibrio entre sustancias proangiogénicas, que se estimulan por hipoxia, inflamación o alteraciones genéticas, y sustancias antiangiogénicas. Entre los factores proangiogénicos se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF)<sup>82</sup>.

Hoy en día está aceptado que para que las células tumorales puedan expandirse es necesario que controlen los mecanismos de angiogénesis, capacidad que adquieren durante la progresión tumoral, como consecuencia de mutaciones en los genes encargados de regular este proceso<sup>69</sup>.

El proceso de angiogénesis puede dividirse en tres etapas: proliferación de células endoteliales, degradación de la matriz extracelular y migración de las células endoteliales en dirección a la masa tumoral<sup>83</sup>.

Los nuevos vasos son defectuosos, en parte por estar compuestos por células de origen no endotelial y también por tener una arquitectura festoneada como consecuencia de tener menos pericitos que los vasos normales. Este es uno de los factores que facilita la difusión de las células tumorales<sup>69</sup>.

## 10.3. Invasión local e intravasación

### 10.3.1. Adhesión celular

Hay dos tipos de adhesión:

- La adhesión **intercelular** (célula a célula), en la que una de las moléculas más importantes es la **E-cadherina**<sup>84,85</sup>.

- La adhesión **a la matriz extracelular**, que permite a las células normales sobrevivir y proliferar. Esta unión viene mediada por las *integrinas*, moléculas de la superficie celular que se unen a la membrana extracelular<sup>84,85</sup>.

Las células tumorales son capaces de vivir sin la adhesión a sus células vecinas y adherirse a una matriz que no les corresponde o sobrevivir sin unirse a ninguna matriz. Para que las células tumorales se desprendan del tumor primitivo y puedan posteriormente dar lugar al desarrollo de metástasis, se tiene que producir la **pérdida de la adhesión intercelular**<sup>69,84,85</sup>.

La organización de las uniones intercelulares está mediada por proteínas transmembrana asociadas a proteínas plasmáticas y al citoesqueleto de actina, y depende de la existencia de uniones adherentes funcionales mediadas por los *complejos cadherina/catenina*<sup>84,85</sup>.

A nivel molecular las interacciones célula-célula del epitelio se producen esencialmente por dos grupos de moléculas de adhesión: la superfamilia de las inmunoglobulinas, independientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la familia de las **cadherinas**, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>86</sup>.

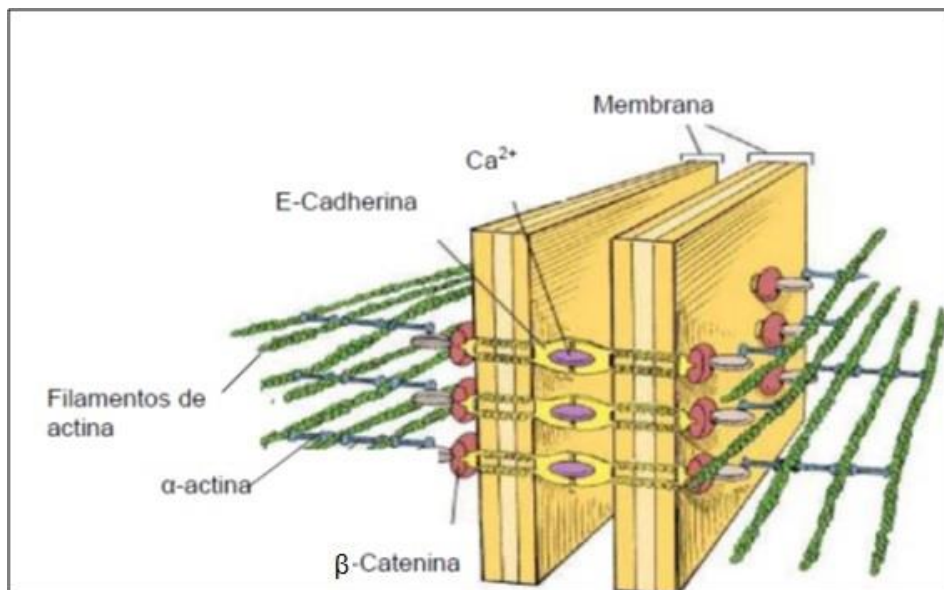


Figura 14. Interacciones célula-célula. Adaptado de Huber MA, 2005<sup>85</sup>.

### 10.3.1.1. *E-cadherina*

Las cadherinas median la adhesión célula-célula en todos los tejidos sólidos. Las primeras tres cadherinas descubiertas se nombraron según el tejido en que fueron encontradas: E-cadherina (epitelios), N-cadherina (nervio y músculo) y P-cadherina (placenta y epidermis)<sup>86</sup>.

E-cadherina es una glicoproteína transmembrana de 120 kDa que ha sido muy estudiada por su papel en la transducción de señales, en la comunicación celular, en la embriogénesis, en la supresión de la invasión y metástasis y en la apoptosis<sup>87</sup>.

Además de la función física de E-cadherina en las uniones adherentes, su interacción con moléculas implicadas en la transducción de señales, como  $\beta$ -catenina, EGFR o erbB2, hace que intervenga en la señalización y diferenciación<sup>88,89</sup>.

El gen *E-cadherin* (*CDH1*) se localiza en el cromosoma 16, locus 16q22.1 y se considera un gen supresor de tumores<sup>90,91</sup>.

La inactivación de la adhesión mediada por la E-cadherina se asocia con la progresión tumoral, como se ha observado en diferentes tipos de tumores. Con anticuerpos anti-E-cadherina se induce o se incrementa la capacidad invasora de las células tumorales, mientras que al transfectar dichas células con el gen de la E-cadherina se pierde el fenotipo agresivo<sup>92-94</sup>.

Otros autores han demostrado que la pérdida de expresión de E-cadherina se asocia a un peor pronóstico y al desarrollo de metástasis, en múltiples tumores<sup>95</sup>, como se expone a continuación.

En cáncer de mama, se ha comunicado que E-cadherina media la transición hacia la progresión metastásica y la relación de la supervivencia con su expresión en ganglios linfáticos<sup>96-97</sup>.

En cáncer de próstata una menor expresión de E-cadherina se ha asociado a peor pronóstico, concretamente se ha observado una correlación inversa con el grado tumoral y con el estadio, así como asociación con una menor supervivencia<sup>98</sup>.

En tumores uroteliales vesicales la pérdida de expresión de E-cadherina se ha asociado a desdiferenciación celular, estadio más avanzado y menor supervivencia a 5 años<sup>99</sup>. Otros autores han corroborado el valor pronóstico de E-cadherina en este tumor<sup>100</sup>.

En carcinomas tiroideos diferenciados la detección de E-cadherina se ha asociado con la evolución clínica (la falta de expresión de esta molécula fue factor pronóstico independiente, asociado a una menor supervivencia)<sup>101</sup>.

En cáncer de ovario la pérdida de E-cadherina también parece favorecer las metástasis<sup>102</sup>.

En cuanto a tumores digestivos, conocida es la importancia de la pérdida de E-cadherina y su asociación al adenocarcinoma gástrico de tipo difuso. Además, disponemos de datos que correlacionan la pérdida de expresión de esta molécula a una menor supervivencia<sup>103</sup>.

En cáncer de páncreas también se ha relacionado la pérdida de la expresión de E-cadherina con alto grado, afectación ganglionar y estadio avanzado<sup>104</sup>.

En **cáncer colorectal**, existen numerosos artículos científicos sobre el papel de E-cadherina:

Por una parte, muchos estudios han descrito una expresión anormal (definida como inmunoreactividad disminuida en comparación con mucosa no tumoral y/o reacción citoplasmática en lugar de en la membrana) de E-cadherina en la mayoría de los casos de CCR<sup>105,106</sup>.

Diversos autores además de demostrar que la expresión de E-cadherina está disminuida en el CCR, han estudiado también la expresión de otras moléculas implicadas en la adhesión, como las cateninas<sup>107,108</sup>.

La pérdida de expresión de E-cadherina y paso de E-cadherina a N-cadherina son características de la transición epitelio-mesénquima (TEM) en CCR<sup>109,110</sup>.

Como en otros tumores, también en el CCR se ha intentado **correlacionar la expresión de E-cadherina con el pronóstico** de los pacientes:

- Por una parte, se ha asociado con la diferenciación tumoral<sup>111</sup>.
- Hay datos que apoyan que aquellos pacientes con CCR con mayores niveles de ARNm de E-cadherina tendrían una mayor supervivencia a 5 años <sup>112</sup>.
- En un análisis realizado mediante microarrays para evaluar el valor pronóstico de las moléculas de la vía de señalización Wnt (APC,  $\beta$ -catenina y E-cadherina) en CCR, el incremento de expresión nuclear de  $\beta$ -catenina y la pérdida de expresión de membrana de E-cadherina estaban asociadas, de forma independiente, con mayor afectación ganglionar, invasión vascular y peor supervivencia en los tumores sin inestabilidad de microsatélites. Además, hubo también asociación entre la pérdida de E-cadherina y el estadio “T” (tumor primario)<sup>113</sup>.
- La relación entre la pérdida de E-cadherina y la afectación ganglionar en CCR también se mostró en otro estudio posterior, en el que los tumores con ganglios positivos tuvieron pérdida significativa de esta molécula y los autores lo consideran posible predictor del estadio “N” (ganglionar) <sup>114</sup>.
- Trabajos más recientes han seguido planteando el papel pronóstico de la expresión de E-cadherina por inmunohistoquímica, junto con la de otras moléculas, en CCR<sup>115</sup>.

#### **10.3.1.1.1. Regulación de la expresión de E-cadherina**

La expresión de E-cadherina es silenciada durante el proceso normal de transición epitelio-mesénquima y posteriormente su expresión es fundamental para el mantenimiento de la morfología epitelial<sup>116</sup>. Su regulación al alta o la baja está asociada con la ganancia o la pérdida de la adhesión célula-célula (Figura 15) y la pérdida de su expresión es necesaria para la adquisición de fenotipo invasivo en los tumores epiteliales<sup>117</sup>.

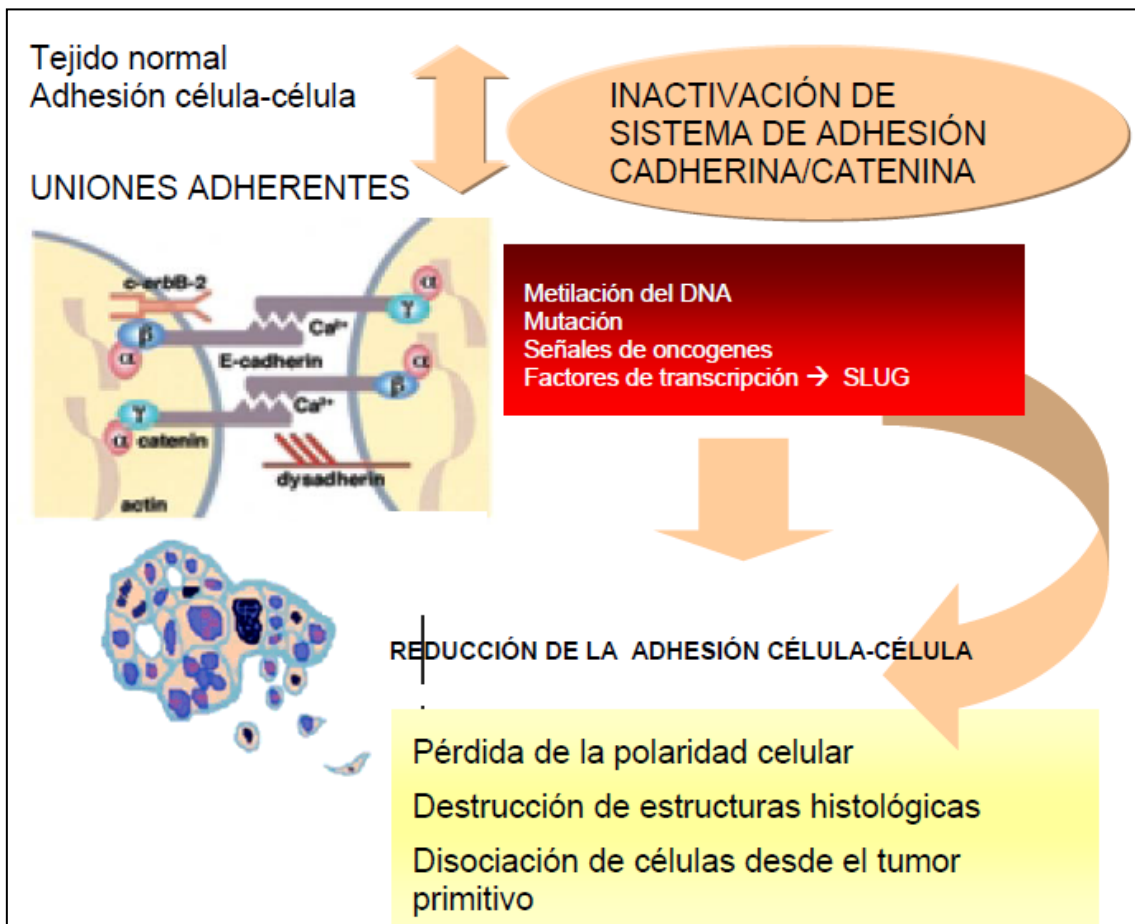


Figura 15. Mecanismo de regulación del sistema de adhesión celular de E-cadherina. De: Del Barco, 2006<sup>72</sup>.

La expresión del gen de *E-cadherina* está regulada por una combinación de factores activadores que actúan sobre el promotor basal y de factores inhibidores que interaccionan con un elemento palindrómico, E-pal (Figura 16).

La transcripción basal de E-cadherina se encuentra activada por un complejo postranscripcional donde se combinan factores como RB, c-Myc o AP-2 y que determina la base del fenotipo epitelial<sup>118</sup>. Otros factores como el Wt-1 o el receptor de la vitamina D también estimulan su expresión<sup>119,120</sup>.

Más del 90% de los factores reguladores de E-cadherina conocidos son factores de transcripción que se unen a las regiones del promotor denominadas E-box e inhiben la transcripción de E-cadherina, entre ellos: Factores nucleares



como *Smad interacting protein* (SIP-1), factores de la familia bHLH (E12/E47) y miembros de la familia **SNAIL**<sup>95,121-124</sup>.

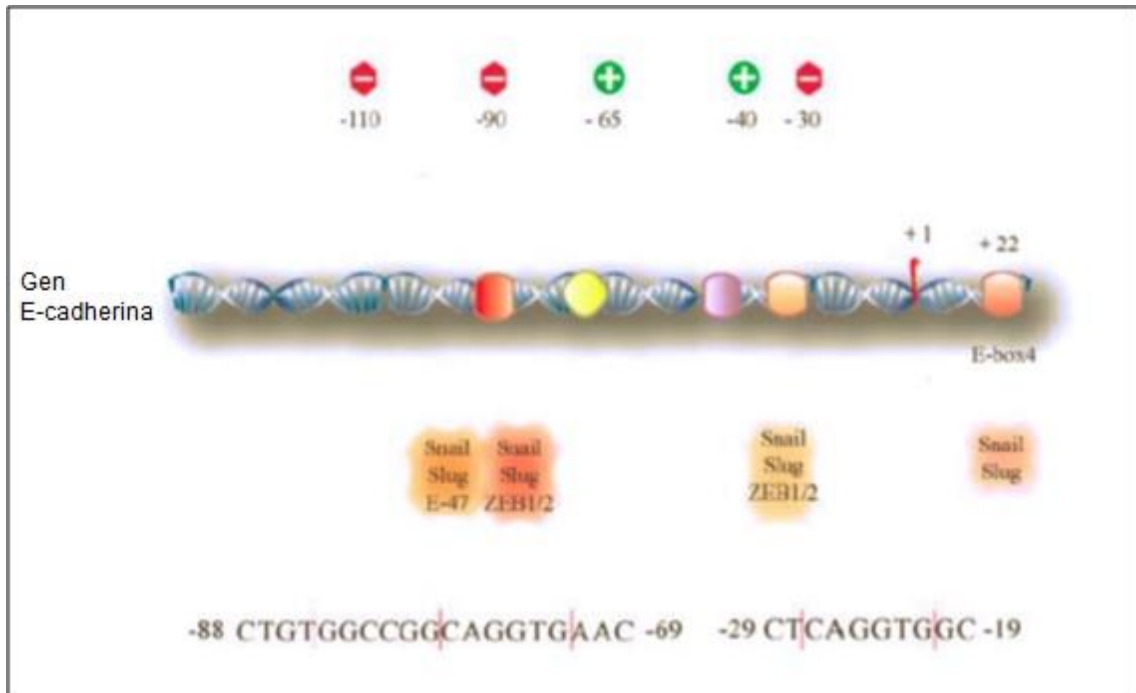


Figura 16. Regulación de la expresión de E-cadherina. Adaptado de Peinado 2004<sup>121</sup>.

Se ha mostrado que los miembros de la familia *SNAIL* ejercen su represión sobre E-cadherina por reclutamiento del co-represor mSin3A y las histonas deacetilasas (HDAC) 1 y 2. El reclutamiento de este complejo requiere del dominio N-terminal SNAG de *SNAIL*<sup>125</sup>.

Así pues, los mecanismos moleculares que controlan la regulación de E-cadherina y *SNAIL* son de vital importancia para el proceso de invasión celular (ver más adelante, apartado de genes *SNAIL*).

### 10.3.2. Degradación de la matriz extracelular

Las células tumorales secretan enzimas que contribuyen a degradar la matriz extracelular. Se han relacionado con el proceso de invasión tumoral varios tipos de *proteasas*: serina, cisteína y metalo-proteinasas. La lisis

inducida por estas enzimas o sus sustratos ocurre en una zona cercana a la superficie tumoral, donde la concentración de enzimas activas supera la acción de las proteínas inhibidoras presentes en el suero y en la propia matriz<sup>69</sup>.

Además, para penetrar en el torrente circulatorio, las células tumorales degradan la matriz que recubre los vasos sanguíneos y linfáticos.

### 10.3.3. Locomoción de la célula tumoral

Tras la pérdida de las uniones intercelulares y la adquisición de propiedades proteolíticas, la célula tumoral ha de moverse hacia la zona de la matriz modificada por la proteólisis. Para ello son fundamentales factores de motilidad secretados por la propia célula tumoral. Se conocen múltiples genes que pueden condicionar la capacidad de motilidad de las células tumorales, entre ellos genes de la familia **SNAIL**, implicados en la transición epitelio-mesénquima<sup>84,126</sup>.

Diversos factores quimiotácticos favorecen la locomoción de las células tumorales en distintas direcciones: hacia estructuras vecinas, vasos linfáticos o capilares sanguíneos<sup>69,84</sup>.

Por tanto, el proceso de **invasión** supone la pérdida de las uniones intercelulares y la adquisición de propiedades proteolíticas y migratorias. Este proceso se asemeja al proceso de transición epitelio-mesénquima, crucial en la generación de diferentes tejidos durante el desarrollo embrionario<sup>127</sup>. El proceso de adquisición de un fenotipo invasivo puede ser considerado como una versión patológica del proceso de TEM de la embriogénesis<sup>84,85</sup>. Durante el proceso de TEM las células epiteliales pierden su fenotipo epitelial (interacciones célula-célula, sin motilidad) y adoptan un fenotipo de célula mesenquimal (pérdida de adhesión célula-célula, incremento de la motilidad e invasión de los tejidos circundantes)<sup>85</sup>.

## **10.4. Transporte e interacción**

Después de entrar en el sistema vascular, las células tumorales se diseminan hasta tejidos distantes, viajando de manera individual o formando agregados con otras células, y escapando del sistema inmunitario<sup>69,84</sup>.

## **10.5. Adhesión**

Para su implantación a distancia, las células tumorales pueden adherirse directamente al endotelio de los vasos del órgano diana, o bien quedar retenidas mecánicamente en los microcapilares<sup>84</sup>.

## **10.6. Extravasación y migración**

Las células que se adhieren al endotelio pueden inducir una rápida retracción de las células endoteliales que les permite interaccionar con la membrana basal. Posteriormente se produce la destrucción de la membrana basal, a la vez que se forman pseudópodos en la célula tumoral, atravesando la membrana. Finalmente las células endoteliales se relajan, completándose la extravasación de las células tumorales, que quedan separadas del torrente circulatorio<sup>69,128</sup>.

## **10.7. Metástasis**

La llegada de una célula tumoral o un grupo de ellas a un órgano, no implica necesariamente el desarrollo de una metástasis clínicamente aparente. Estas células pueden quedar en fase latente durante un periodo de tiempo variable, durante el que podrían ser destruidas por diversos mecanismos inmunológicos, entrar en apoptosis o proliferar cuando las condiciones del microambiente cambien, a veces años después de la extirpación del tumor primario<sup>129</sup>.

## 11. GENES *SNAIL*

### 11.1. Familia *ZINC FINGERS*, tipo C2H2

El primer miembro de la familia *SNAIL* fue descrito inicialmente en *Drosophila melanogaster*, donde se demostró que era esencial para la formación del mesodermo<sup>130</sup>.

Los miembros de esta familia codifican factores de transcripción cuya interacción con el ADN la realizan a través de los dominios estructurales denominados dedos de zinc (*zinc-finger*). Estos dominios son elementos estructurales muy estables cuya particularidad es la coordinación de uno o más átomos de zinc a través de residuos de cisteína e histidina. Pueden ser clasificados por el tipo y orden de estos residuos de coordinación con el zinc (por ejemplo, Cys2His2, Cys4, y Cys6). Un método más sistemático los clasifica en distintos "grupos de pliegues" basado en la forma de la columna de la proteína en el dominio plegado. El "grupo de pliegues" más común de dedos de zinc es el de tipo Cys2His2 (el "clásico dedo de zinc", figura 17)

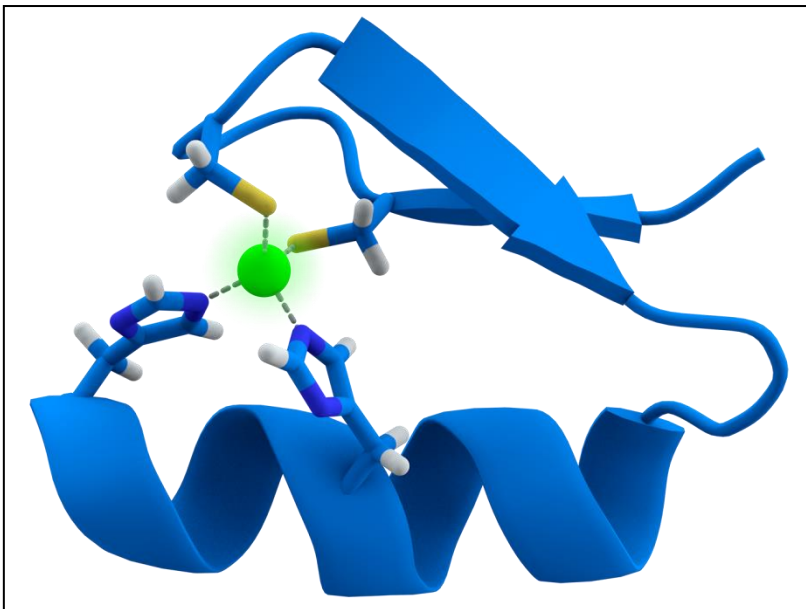


Figura 17. Representación del motivo de dedo de zinc Cys2His2. Consiste en una hélice alfa y una lámina beta antiparalela. El ion de zinc (verde) está coordinado por dos histidinas y dos cisteínas. De: [https://en.wikipedia.org/wiki/Zinc\\_finger](https://en.wikipedia.org/wiki/Zinc_finger).

Actualmente los genes de la familia *SNAIL* se engloban en la llamada **familia de dedos de zinc (*Zinc fingers*) tipo C2H2**. El grupo de plegamiento tipo Cis2His2 es la clase de dedos de zinc mejor caracterizados y es muy común en factores de transcripción de mamíferos. Esta clase de dedos de zinc puede tener una variedad de funciones tales como la unión a ARN y las interacciones proteína-proteína, pero es mejor conocida por su papel en la unión a secuencias específicas de ADN<sup>126, 131</sup>.

En vertebrados se han caracterizado 3 subfamilias de genes *SNAIL*: *SNAI1* (*SNAIL family zinc finger 1*, denominado *SNAIL* en muchos trabajos), *SNAI2* (*SNAIL family zinc finger 2*, también denominado *SLUG*), y *SNAI3* (*SNAIL family zinc finger 3*)<sup>126,131</sup>.

En humanos ***SNAI2 (SLUG)*** se localiza en el brazo largo del cromosoma 8 (8q11.21), como se muestra en la siguiente figura. Este gen contiene 3 exones que codifican para una proteína de 268 aminoácidos, con 5 dominios tipo *zinc-finger*, y que se expresa en placenta, corazón adulto, páncreas, hígado, riñón y músculo esquelético.

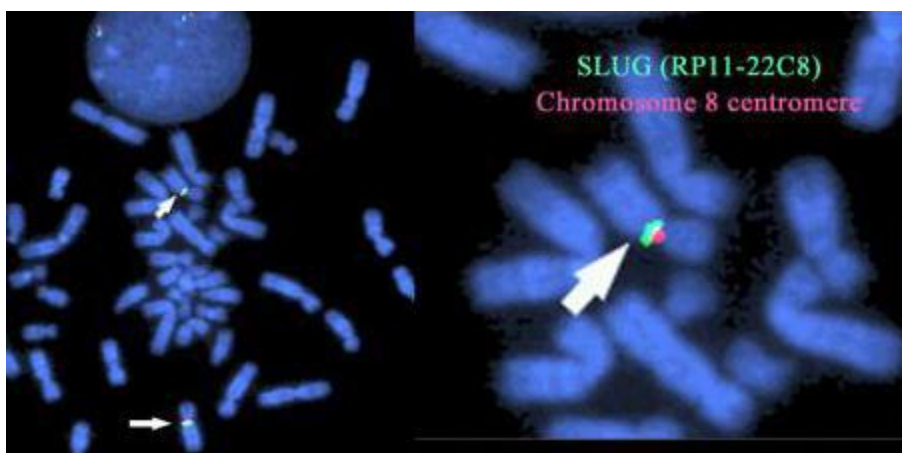


Figura 18. Localización del gen *SNAI2 (SLUG)* en el brazo largo del cromosoma 8. De: Sánchez- Martín M, 2004<sup>133</sup>.

## 11.2. Funciones de la familia *SNAIL*

### 11.2.1. Transición epitelio-mesénquima (TEM)

La transición epitelio-mesénquima es el proceso por el cual una célula epitelial se convierte en otra de tipo fibroblástico, con propiedades migratorias e invasivas. La TEM es crucial para la formación de distintos tejidos embrionarios (principalmente el mesodermo y la cresta neural) y, en condiciones patológicas, existen evidencias del importante papel que desarrolla en el proceso de progresión tumoral<sup>110,134</sup>.

Durante la TEM se produce una pérdida de la polaridad epitelial y de la adhesión celular, y la adquisición de un fenotipo fibroblastoide y migratorio. Para ello se requiere la reorganización del citoesqueleto, con la consiguiente pérdida de proteínas específicas del epitelio, como la **E-cadherina**, la inducción de marcadores mesenquimales, como la vimentina o la fibronectina, y la síntesis de enzimas proteolíticas implicadas en la degradación de la matriz<sup>110,134</sup>.

Entre los factores de transcripción que controlan el proceso de TEM se encuentran los genes ***SNAIL***<sup>135</sup>. La inducción del proceso de TEM producido por los genes *SNAIL* convierte a las células epiteliales en células con características mesenquimales y propiedades migratorias e invasivas (adquisición del fenotipo invasivo) estando íntimamente ligado a la patogénesis del cáncer en mamíferos.

Los factores de transcripción de la familia *SNAIL* inducen el proceso de TEM principalmente a través de la represión de la transcripción de **E-cadherina** tanto durante el desarrollo embrionario como durante el proceso de progresión tumoral y la carcinogénesis de distintos tipos de tumores, entre ellos el **CCR**<sup>123,110,140</sup>.

El proceso de TEM es proporcional a la pérdida de expresión de **E-cadherina** y la adquisición de propiedades migratorias e invasivas, y constituye uno de los primeros pasos de la cascada metastásica<sup>137</sup> (Figura 19).

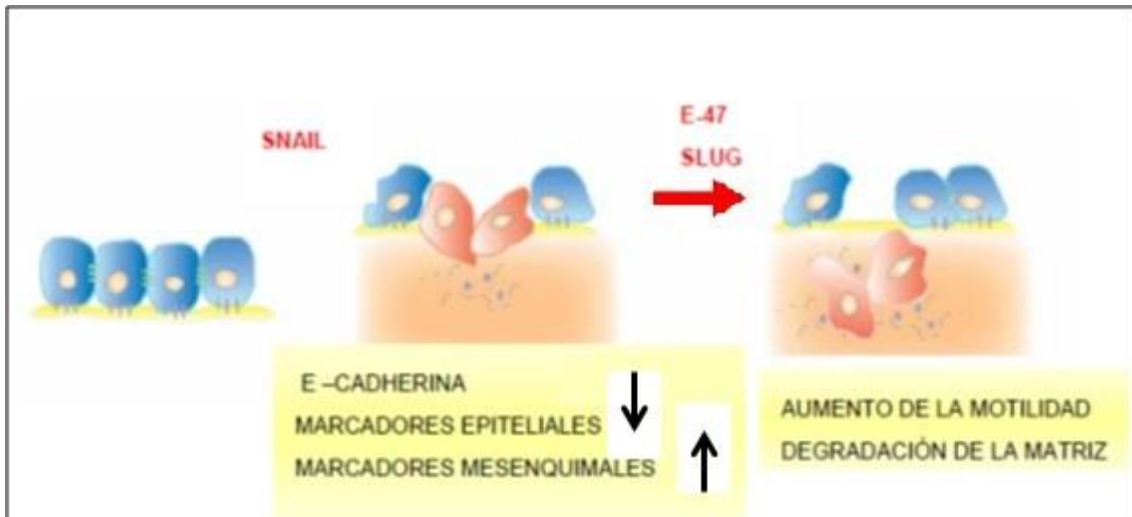


Figura 19. Transición epitelio-mesénquima: Pérdida de adhesión e invasión local. Adaptado de Peinado, 2004.

Por otra parte, *SNAIL* puede producir una regulación a la baja de los componentes de las uniones adherentes independientemente de la regulación de E-cadherina<sup>141</sup>.

En las células epiteliales que expresan *SNAIL* no se demuestra un incremento de la proliferación celular, sino más bien un efecto que va más a favor de la invasión y la motilidad celular. Este desarrollo de un fenotipo invasivo está relacionado con la adquisición de propiedades malignas pero no con su formación o con su crecimiento. Además, *SNAIL* favorece también la invasión celular a través de propiedades angiogénicas<sup>142</sup>.

El proceso de TEM patológico no sólo se observa durante la progresión tumoral, sino también en otras circunstancias, como en el caso de fibrosis. *SNAIL* se encuentra activado en las células mesoteliales de pacientes que desarrollan fibrosis retroperitoneal tras periodos prolongados de diálisis peritoneal<sup>143</sup>. Se ha descrito también expresión de *SNAIL* en procesos de fibrosis renal<sup>144</sup>. La expresión de *SNAIL* puede producirse ante cualquier daño producido sobre células epiteliales, así *SNAIL* se encuentra activado durante el proceso de curación de las heridas<sup>145</sup>.

### 11.2.2. Otras funciones de *snail*

*SNAIL* tiene otras funciones, independientes de la TEM, que se exponen a continuación.

#### 11.2.2.1. Inductor de supervivencia

Durante el desarrollo embrionario, la expresión de *SNAIL* protege a ciertas células de la apoptosis, como se ha comprobado durante el desarrollo de la cresta neural y en las células epiteliales de la línea media del paladar<sup>146,147</sup>.

En el ratón *min*, un modelo de **cáncer de colon** en ratón, la regulación a la baja de *SNAIL* se relaciona con un incremento en la muerte celular, confirmando su papel en la supervivencia de las células tumorales<sup>148</sup>.

En humanos, una traslocación convierte al represor del factor de leucemia hepático (HLF) en un activador que induce a *SNAI2* y lleva a una supervivencia aberrante de las células y al desarrollo de leucemia<sup>149</sup>.

Las células que expresan *SNAIL* son resistentes a la acción de la apoptosis y al daño del ADN, bloqueando el ciclo celular y confiriendo resistencia a la muerte<sup>146,150-152</sup>.

Resumiendo, durante el desarrollo embrionario las proteínas *SNAIL* protegen de la muerte a las células que se encuentran en migración, proporcionando una ventaja selectiva a las células embrionarias y permitiendo su llegada a territorios distales. En las células tumorales esta ventaja (motilidad, invasividad y supervivencia) posibilita su capacidad para desplazarse a distancia y desarrollar metástasis

En conclusión, los genes *SNAIL* intervienen en procesos de represión de marcadores epiteliales, inducción de marcadores mesenquimales, adquisición de propiedades invasivas, proliferación celular y supervivencia (Figura 20).



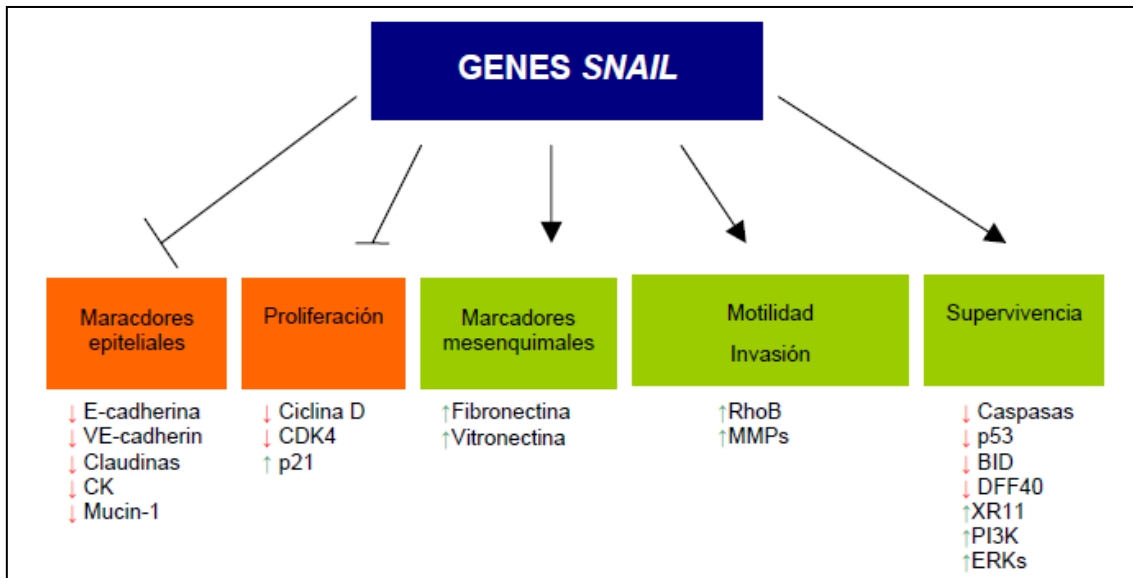


Figura 20. Funciones de los genes *SNAIL*. De Del Barco, 2006. Adaptado de Barrallo-Gimeno, 2005. La sobreexpresión de *SNAIL* en células epiteliales induce: Disminución en la expresión de marcadores epiteliales (E-cadherina, citoqueratina 18, mucina 1, desmoplaquina), incremento en la expresión de marcadores mesenquimales (vimentina, fibronectina), fenotipo fibroblastoide, adquisición de actividad tumoral y propiedades invasivas/migratorias, resistencia a la muerte, disminución de proliferación (durante la etapa de malignización) y pérdida de diferenciación. BID, *BH3 interacting domain death agonist*, agonista de muerte de dominio interactivo; CDK, *cyclin dependent kinase*, quinasa dependiente de ciclinas; DFF, *DNA fragmenting factor*, factor fragmentador de ADN; ERKs, extracellular regulated kinases, quinasas reguladas por señal extracelular; MMPs, matrix metalloproteinases, metaloproteinasas de matriz; PI3K, phosphoinositide 3-kinase, fosfoinositol 3-quinasa; Rb, retinoblastoma; XR11, homólogo de *Xenopus Bcl-xL*.

### 11.3. Células madre cancerígenas (*cancer stem cells*) y genes *SNAIL*

La primera evidencia de células madre tumorales se realizó en modelos de leucemia mieloide aguda<sup>153,154</sup>. Como ya se ha comentado previamente, también se han identificado células madre en tumores sólidos, como en el cáncer de mama, cerebro, hígado, páncreas, pulmón, piel o **colon**<sup>155-159</sup>.

La hipótesis de que las células tumorales *stem* son responsables del cáncer humano, de la invasión y el desarrollo de metástasis está sustentada en modelos celulares y animales<sup>77,160-162</sup>.

Los genes de la familia **SNAIL** están implicados en la carcinogénesis e intervienen en la regulación de la capacidad de las células *stem* para autorrenovarse<sup>137,138</sup>.

#### 11.4. **SNAIL** como marcador pronóstico

Teniendo en cuenta, como se ha comentado previamente, que la pérdida de función o la represión de **E-cadherina** se asocia a un peor pronóstico tumoral, la familia de genes **SNAIL** (como represores de E-cadherina) podrían ser utilizados como marcadores precoces de malignidad tumoral.

El análisis de biopsias obtenidas de diferentes tipos de tumores sólidos, confirma que *la expresión de SNAIL se correlaciona inversamente con la expresión de E-cadherina y con el grado de diferenciación, y se asocia a la invasividad tumoral y a una menor supervivencia.*

Concretamente en estudios en cáncer de mama, la expresión de **SNAIL**, detectada por RT-PCR (*Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa*) fue frecuente y se asoció intensamente con expresión reducida/negativa de E-cadherina<sup>163</sup>. Otros estudios emplearon la inmunohistoquímica y el análisis por PCR cuantitativa, objetivando que la detección de **SLUG** se incrementaba con el grado tumoral y se asociaba a tumores de pacientes con enfermedad recurrente o metastásica<sup>164</sup>. Igualmente, investigadores que analizaron la expresión de **SNAIL** mediante hibridación *in situ*, mostraron que se correlacionaba inversamente con el grado de diferenciación de los tumores y que se expresaba en todos los carcinomas ductales infiltrantes que presentaban metástasis ganglionares. Además, **SNAIL** se expresaba en algunos tumores desdiferenciados con ganglios negativos. Ante estos resultados los autores concluían que **SNAIL** estaba implicado en la progresión de los carcinomas ductales mamarios y que podría ser un marcador del potencial metastásico<sup>165</sup>. Adicionalmente, en pacientes con cáncer de mama disponemos de datos que relacionan los altos niveles de **SNAIL** con una menor supervivencia libre de recidiva<sup>166</sup>.

Así mismo, hay trabajos que establecen su papel como factor pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad en adenocarcinoma de pulmón<sup>167</sup>. En la histología escamosa también se ha asociado la expresión de *SLUG* a un peor pronóstico<sup>168</sup>. Otro estudio más reciente en cáncer de pulmón no microcítico metastásico ha mostrado que los pacientes con alta expresión de *SLUG* tienen una supervivencia significativamente menor que la de los pacientes con baja expresión<sup>169</sup>.

De igual forma, en carcinoma escamoso de cabeza y cuello los niveles bajos de E-cadherina y altos de *SLUG* se correlacionan con la recidiva tumoral y con una menor supervivencia libre de enfermedad<sup>170,171</sup>.

En el caso del carcinoma escamoso esofágico, los tumores con menor expresión de E-cadherina o con expresión positiva de *SLUG*, invaden más en profundidad, tienen mayor invasión linfática, más metástasis ganglionares y peor evolución clínica que los tumores con expresión de E-cadherina preservada o cuya expresión de *SLUG* es negativa<sup>172</sup>.

De forma similar, en cáncer gástrico los tumores con expresión reducida de E-cadherina o expresión positiva de *SLUG* tienen mayor invasión linfática y vascular, más metástasis ganglionares y peor estadio que los tumores con E-cadherina preservada o *SLUG* negativo. Además, la expresión de *SLUG* se correlaciona con la pérdida de E-cadherina. Los pacientes con expresión reducida de E-cadherina o positividad para *SLUG* tienen peor evolución clínica. En el grupo de E-cadherina preservada, la supervivencia a 5 años es mejor para los pacientes sin expresión de *SLUG* que en los que sí la tienen. Sin embargo, según el análisis multivariante la expresión de E-cadherina y de *SLUG* no serían factores pronósticos independientes<sup>173</sup>.

En carcinoma hepatocelular, la expresión de *SNAIL* también aumentó significativamente con la desdiferenciación tumoral y se correlacionó con la invasión de la vena porta y las metástasis intrahepáticas, así como con una menor supervivencia libre de recidiva. Además, la expresión de *SNAIL* resultó ser un factor de riesgo independiente para recurrencia temprana tras resección curativa<sup>174</sup>.

SNAIL y SLUG han sido estudiados en carcinoma de células renales. En este caso, la expresión de SNAIL sí se ha correlacionado con el estadio patológico del tumor, el grado y la presencia de carcinoma sarcomatoide, así como con una peor supervivencia. Sin embargo, esto no ha ocurrido con la expresión de SLUG<sup>175</sup>.

En carcinomas endometriales de alto grado la expresión de SLUG se ha correlacionado con la recidiva tumoral y una peor supervivencia, tanto libre de recidiva como global<sup>176</sup>.

En pacientes con timoma disponemos de datos de supervivencia a 10 años mejores para los pacientes con baja expresión de SLUG. Sin embargo, en el análisis multivariante SLUG no demostró ser un factor pronóstico independiente<sup>177</sup>.

También hay estudios en sarcoma sinovial que comunican la relación inversa entre la expresión de E-cadherina y de SNAIL<sup>178</sup>.

Un reciente trabajo sobre GIST ha comunicado que la expresión de SLUG en este tumor está asociada con factores de mal pronóstico y con una peor supervivencia libre de recidiva, tanto en pacientes tratados sólo con cirugía como en los que reciben además imatinib adyuvante<sup>179</sup>.

En **cáncer de colon**, conocemos que la alta expresión del receptor de vitamina D se asocia a buen pronóstico y que se pierde durante la progresión tumoral. Pues bien, hay datos que avalan que la expresión elevada de SNAIL se asocia con la inhibición de este receptor<sup>180</sup>.

En 2005 se publicó un trabajo en el que se comunicaba que *SNAIL* no se detectaba en la mucosa colónica sana, mientras que existía inmunoreactividad en el 75% de los tumores colorrectales estudiados. Además de que *SNAIL* estaba sobreexpresado en CCR, esta sobreexpresión tendía a ser más frecuente en los tumores metastásicos<sup>181</sup>.

Adicionalmente, la expresión de SLUG se ha mostrado como factor pronóstico independiente en CCR, asociándose no sólo al estadio tumoral y al desarrollo de metástasis, sino también con una peor supervivencia global. Los

pacientes con positividad para *SLUG* y expresión baja de E-cadherina son los que muestran peor pronóstico<sup>182</sup>.

Otro trabajo posterior ha estudiado la expresión de *SLUG* y Vimentina en CCR, resultando significativamente mayor en pacientes con mayor estadificación del tumor primario (T), con afectación ganglionar, con metástasis hepáticas y con estadio TNM avanzado. Hay correlación entre la expresión de *SLUG* y de Vimentina y la expresión aumentada de ambos se asocia de manera significativa con un peor pronóstico. Los pacientes con alta expresión de *SLUG* tienen menor supervivencia libre de enfermedad y global que los pacientes con baja expresión de *SLUG*. Además, la alta expresión de *SLUG* resulta factor pronóstico independiente y predictivo de las metástasis ganglionares en CCR<sup>183</sup>.

Por otra parte, ese mismo año (2013) se publica un estudio analizando el papel de *SNAI1* en CCR y sus resultados son muy diferentes, ya que aunque *SNAI1* está presente en el 76% de los tumores, no se observa correlación con la pérdida de E-cadherina, ni con el grado, ni con el estadio. Tampoco se identifica en este estudio impacto de *SNAI1* sobre la supervivencia. Los autores concluyen que la pérdida de E-cadherina observada se podría explicarse como consecuencia de otras vías que intervienen en la TEM<sup>184</sup>.

En un metaanálisis publicado en 2016, que incluyó 29 estudios, en diferentes tumores, concluyó que la alta expresión de *SLUG* detectada mediante inmunohistoquímica (23 estudios) indicaba peor pronóstico en términos de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de progresión. Sin embargo, los resultados no fueron los mismos al analizar los datos de los 6 estudios en los que la expresión de *SLUG* se había detectado mediante RT-PCR cuantitativa<sup>185</sup>.

Resultados de trabajos de nuestro grupo sugieren que es posible la detección de mRNA de *SLUG* en muestras de **sangre periférica** de pacientes con cáncer de mama, de manera que podría constituir un atractivo método de detección de células tumorales aisladas con características de *stem cell cancer* en sangre periférica<sup>186-188</sup>.

## 12. DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Las células tumorales aisladas en sangre periférica fueron descritas por primera vez en 1834, cuando Sanson<sup>189</sup> describió este fenómeno como “diathèse cancéreuse”. Posteriormente, en 1869, también las describió Asworth<sup>190</sup>, y a principios del siglo XX Ryall<sup>191</sup> describió este proceso como “infección por cáncer”

Entre los años 40 y 50 se publicaron muchos estudios sobre la demostración citológica de células tumorales en sangre periférica y en médula ósea<sup>192</sup>. En los años 80, con el desarrollo de las técnicas de PCR, se produjo un gran desarrollo en esta área<sup>193,194</sup>.

El concepto de célula tumoral aislada se refiere a la presencia de células tumorales únicas o pequeños grupos de ellas, que no se han extravasado, ni implantado, ni han invadido el estroma<sup>195</sup>.

Respecto a la detección en médula ósea, las muestras de sangre periférica suponen una técnica mínimamente invasiva y menos dolorosa, pudiendo realizarse las extracciones más frecuentemente. Como desventaja, la sensibilidad de la detección es menor en sangre periférica<sup>196,197</sup>.

El mayor problema para la detección de células tumorales en sangre periférica es el bajo porcentaje de ellas (se ha descrito una proporción de 1 célula tumoral por  $10^5$ - $10^7$  células mononucleadas) además de que pueda existir cierta dificultad para distinguirlas de células hematopoyéticas o células epiteliales normales<sup>198</sup>.

### 12.1. Técnicas de detección

Se han estudiado numerosas moléculas como posibles **marcadores** de células tumorales. El marcador ideal sería universal, pero únicamente expresado por las células tumorales del tumor correspondiente; debería distinguir específicamente células epiteliales que no se expresan en sangre periférica, su expresión debería encontrarse en el 100% de las células

tumorales, tener un fenotipo similar al tumor primario y ser capaz de detectar células con capacidad para producir metástasis <sup>199</sup>.

Entre los marcadores estudiados se encuentran citoqueratinas, antígenos de membrana, moléculas transmembrana... Y también marcadores de transición epitelio-mesénquima (como *SLUG*)<sup>200,201</sup>.

Así mismo, se han desarrollado varias **técnicas** de detección, más allá de los estudios cito-patológicos, como son las técnicas de inmunocitoquímica y los métodos moleculares (como la RT-PCR) que detectan células tumorales a través de sus proteínas específicas o de la expresión de marcadores genéticos específicos<sup>200</sup>.

Las características que debería cumplir un método de detección de células tumorales aisladas para poder incorporarse a la práctica diaria son:

- Sensibilidad: Capacidad para detectar un pequeño número de células tumorales entre una mayoría de células normales.
- Especificidad: Capacidad de distinguir entre células tumorales y células normales de la muestra.
- Reproducibilidad: El método debe ser objetivo y fácilmente estandarizable.
- Utilidad clínica: Debe proporcionar información cualitativa y/o cuantitativa sobre las células tumorales de reconocido valor para la estadificación, evolución pronóstica o monitorización de los pacientes.

La inmunocitoquímica se ha considerado una de las técnicas de referencia. Su sensibilidad y especificidad han sido mejoradas mediante el estudio de múltiples marcadores específicos de forma simultánea o por técnicas de enriquecimiento y separación inmunomagnética, que han permitido aumentar la sensibilidad sin alterar el perfil de expresión génica, y por la incorporación de sistemas de detección automáticos como el sistema Cell Search<sup>TM</sup> (Veridex LLC, Johnson & Johnson company)<sup>202,203</sup>.

Con el fin de mejorar la sensibilidad y automatización de las técnicas inmunocitoquímicas, diferentes autores recomiendan el empleo de métodos moleculares para la detección de células tumorales. El procedimiento que ha sido más usado es la reacción en cadena de la polimerasa a partir de RNA empleando la técnica de la transcriptasa inversa (**RT-PCR**)<sup>204</sup>. También se ha incorporado la tecnología de los microarrays para la detección de marcadores de células tumorales circulantes<sup>204</sup>.

## 12.2. Significado de su detección

En cuanto al significado de las células tumorales detectadas en sangre periférica, se sabe que muchas de ellas irán a apoptosis, pero otras tendrán capacidad de crecimiento y multiplicación<sup>198,205</sup>.

Además, existe la teoría de que las poblaciones celulares de la mayoría de tumores son heterogéneas y sólo un número limitado de ellas tienen capacidad para iniciar un tumor, es decir, que difieren entre ellas en su capacidad proliferativa y en su potencial metastásico. Este sería el caso de la teoría de las células madre cancerígenas (*cancer stem cells*). Teniendo esto en cuenta, la detección de células tumorales circulantes que fueran células “diferenciadas” y no células madre podría ser clínicamente irrelevante<sup>199,206</sup>. Por este motivo sería importante seleccionar células tumorales circulantes con características genéticas propias de célula madre cancerígena, como los marcadores de TEM<sup>200,207</sup>.

### 12.2.1. Valor pronóstico

La detección de células tumorales circulantes (CTCs) es un importante marcador pronóstico para diferentes tumores, entre ellos el CCR.

La detección de CTCs puede tener gran importancia tanto en estadios iniciales como avanzados de la enfermedad:



En **CCR localizado**, las CTCs detectadas en el preoperatorio representan un factor pronóstico válido para progresión tumoral y supervivencia<sup>208</sup>. En pacientes en los que se resecó el tumor primario, las CTCs pusieron de manifiesto un mayor riesgo de metástasis tras la cirugía<sup>209</sup>. La persistencia de su detección tras resección con intención curativa es un factor de mal pronóstico, asociándose a una menor supervivencia libre de recidiva<sup>210,211</sup>. Por otra parte, la recurrencia en los pacientes con CCR localizado que reciben tratamiento quimioterápico adyuvante se atribuye principalmente a una mala respuesta al régimen de quimioterapia. Así, el detectar CTCs puede ser útil para identificar de forma precoz las metástasis y seleccionar a los pacientes quimio-resistentes que pudieran beneficiarse de otros regímenes terapéuticos<sup>185</sup>. La persistencia de CTCs tras quimioterapia adyuvante es un marcador potencial para determinar la evolución clínica en pacientes con CCR<sup>212</sup>.

En **CCR metastásico**, según los datos de importantes estudios, las CTCs son marcadores predictivos para la quimioterapia, discriminando prematuramente las potenciales metástasis, seleccionando pacientes resistentes a la quimioterapia y determinando la evolución clínica. Al ser un marcador pronóstico, las CTCs pueden servir para una mejor monitorización de enfermedad en determinados casos de CCR metastásico en los que los niveles de CEA y otros marcadores no se alteran. Además, los niveles elevados de CTCs se asocian a peor supervivencia libre de progresión y peor supervivencia global en pacientes con CCR<sup>185,200,213</sup>.

Adicionalmente, la expresión de marcadores de TEM en las CTCs se ha correlacionado con la recidiva tumoral debido a su transformación en CSCs que inician la recurrencia<sup>214</sup>. La TEM es un proceso por el que las CTCs adquieren capacidad para favorecer las metástasis. *En pacientes con CCR metastásico, examinando en las CTCs la expresión de genes relacionados con la TEM e implicados en la migración celular, se ha observado correlación con la supervivencia global y libre de progresión<sup>215</sup>.*

Otros estudios, realizados en controles sanos y en pacientes con CCR metastásico, han puesto de manifiesto que es posible la caracterización

molecular de las CTCs, con la finalidad de intentar conseguir un tratamiento más individualizado<sup>216</sup>.

Para fortalecer el argumento de que las CTCs pueden ser marcadores de apoyo, se han realizado varios estudios en pacientes con CCR metastásico tratados con quimioterapia, detectando las CTCs en diferentes momentos de la evolución y estudiando su correlación con la respuesta al tratamiento, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global<sup>217-223</sup>. Sin embargo, hay discordancias entre los tratamientos de los pacientes, los tiempos de recogida de las muestras, el valor de referencia de los niveles de CTCs, los métodos de detección y las técnicas de imagen empleadas para evaluar la enfermedad. Incluso estando claro que las CTCs reflejan la respuesta al tratamiento, es necesario unificar criterios para fortalecer su importancia como marcadores útiles en la práctica clínica<sup>203</sup>.

Resumiendo el valor de las CTCs en CCR, podríamos decir que en estadios tempranos su detección se correlaciona con la progresión tumoral y un peor pronóstico, mientras que en enfermedad metastásica los altos niveles de CTCs indican progresión tumoral y peor evolución global<sup>208</sup>.

### **12.2.2. Valor predictivo de respuesta al tratamiento**

Además de lo mencionado anteriormente, las CTCs también pueden ser útiles como biopsia líquida, como alternativa a la biopsia histológica, para estudiar diferentes mutaciones genéticas necesarias para personalizar los tratamientos, teniendo en cuenta además la facilidad para recoger la muestra en distintos momentos evolutivos de la enfermedad<sup>224</sup> (Figura 21).

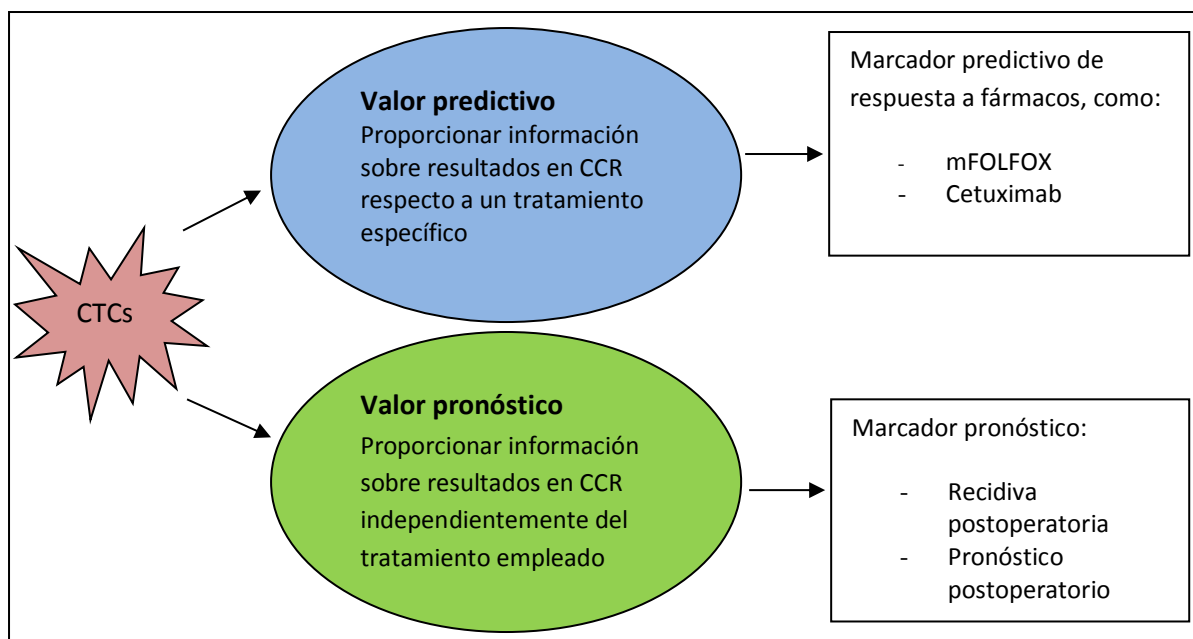


Figura 21. CTCs, valor pronóstico y predictivo. La detección de CTCs y su caracterización puede ser una valiosa herramienta para refinar el pronóstico, y las CTCs pueden ser biomarcadores predictivos. Adaptada de Huang 2016<sup>185</sup>.



# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## JUSTIFICACIÓN

Varios estudios científicos sugieren que el origen de muchos tipos de cáncer reside en una población poco común de células que son las exclusivamente responsables de conservar la capacidad de auto-renovación y mantenimiento del tumor (es decir, “células *stem* cancerígenas” –CSC-) En este contexto, una pequeña población de células cancerígenas adquiriría propiedades características de células *stem*. En algunos casos, las células *stem* tumorales podrían derivar directamente de las células *stem* normales de un tejido. En cualquiera de las situaciones el resultado final sería el mismo, y se ha planteado que serían estas CSC las que deberían emplearse como diana para el tratamiento del cáncer<sup>77,69</sup>. El desafío para esta aproximación es encontrar marcadores de las CSC. *SLUG* (también llamado *SNAIL-2*) es un gen que interviene en el proceso de transición epitelio-mesénquima y está implicado en el desarrollo tumoral a través de la adquisición de propiedades migratorias, invasivas y de supervivencia de las células epiteliales. También se ha mostrado que su activación podría formar parte de las alteraciones moleculares que caracterizarían a las CSC<sup>135-139</sup>. Por otra parte, estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama llevados a cabo por nuestro grupo confirman la posibilidad de detectar células circulantes que expresan *SLUG*<sup>186-188</sup>.

En este trabajo se pretende analizar la detección del gen *SLUG* en sangre periférica y su valor como factor pronóstico en pacientes con cáncer de colon. *SLUG* se expresa en carcinomas de colon humanos por lo que, además de poder ser utilizado para diagnóstico precoz del mismo, pudiera ser una diana terapéutica específica para combatir la diseminación tumoral.

E-cadherina es una glicoproteína transmembrana implicada en transducción de señales, apoptosis y supresión de la invasión y metástasis<sup>87</sup>. La inactivación de la adhesión mediada por ella se asocia con la progresión tumoral. Entre otras funciones, *SLUG* es uno de los factores reguladores de E-

cadherina<sup>95,121-124</sup>, por lo que también se analizará la relación de la expresión de ambos.

Este trabajo pretende estudiar la expresión de estas proteínas en distintas fases de la enfermedad.

## OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES:

1. Determinar el valor pronóstico de la expresión de *SLUG* en cáncer colorrectal localizado y metastásico.
2. Estudiar la relación de *SLUG* con E-cadherina y su valor conjunto como factor pronóstico.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinación de la expresión del gen *SLUG* en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal.
2. Analizar la expresión de E-cadherina en el tejido tumoral de dichos pacientes.
3. Estudiar la relación de la expresión de *SLUG* en pacientes con cáncer colorrectal localizado con otras variables clínico-patológicas de importancia pronóstica reconocida.
4. Examinar la asociación de la expresión de E-cadherina de pacientes con cáncer colorrectal localizado con otras variables clínico-patológicas de importancia pronóstica reconocida.
5. Analizar la relación entre la expresión de *SLUG* en sangre periférica y de E-cadherina en tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal localizado.



6. Determinar la influencia de la expresión de *SLUG* en sangre periférica y de E-cadherina en tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal localizado sobre su supervivencia (libre de enfermedad y global)
7. Estudiar la asociación de la detección de *SLUG* en sangre periférica con otras variables pronósticas en pacientes con cáncer colorrectal metastásico.
8. Analizar la influencia de la expresión de *SLUG* en sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal metastásico sobre su supervivencia (libre de progresión y global)



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Se incluyeron en el estudio 168 pacientes, atendidos en el Servicio de Oncología Médica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, en el período comprendido entre marzo de 2004 y marzo de 2008, de acuerdo a los siguientes criterios.

### **Criterios de inclusión:**

1. Pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal.
2. Disponibilidad de muestra histológica.
3. Otorgamiento de consentimiento informado para la recogida de muestra de sangre periférica para el estudio.
4. Disponer de los datos esenciales, correspondientes a las variables demográficas, clínicas, patológicas, relacionadas con el tratamiento y con el seguimiento de los pacientes, necesarios para los objetivos del estudio.

### **Criterios de exclusión:**

1. No ser posible la detección de *SLUG* en la muestra de sangre periférica extraída.
2. Extracción de la muestra en un momento no adecuado para la homogeneidad de la misma y los objetivos del estudio:
  - a. Para los pacientes con CCR localizado: el momento adecuado de extracción de la primera muestra de sangre periférica se considera al inicio de la adyuvancia o en el seguimiento (en aquellos pacientes que no reciben tratamiento adyuvante) por lo que serían no adecuadas para la finalidad del estudio las extraídas durante el tratamiento adyuvante o al finalizar el mismo.

- b. Para los pacientes con CCR metastásico: el momento adecuado de extracción de la primera muestra de sangre periférica sería en el que la enfermedad estuviera en progresión, por lo que no serían adecuadas para los objetivos del estudio aquellas extraídas con la enfermedad en respuesta a la quimioterapia o tras cirugía de las metástasis.
- 3. En cuanto al estudio de E-cadherina, exclusión de las muestras cuyo resultado del estudio inmunohistoquímico es no valorable.

Las principales **variables** que se recogieron se detallan a continuación:

- Variables demográficas:
  - o Sexo
  - o Edad
- Variables clínicas:
  - o Localización del tumor primario
  - o Localización de las metástasis
  - o Número de localizaciones metastásicas
  - o Estadío clínico
  - o Valor de CEA
- Variables patológicas:
  - o Tipo histológico
  - o Grado histológico
  - o Estadío patológico
- Variables relacionadas con el tratamiento:
  - o Tipo de cirugía
  - o Quimioterapia adyuvante
  - o Quimioterapia para enfermedad avanzada
  - o Número de líneas de tratamiento
- Variables temporales:
  - o Fecha de diagnóstico
  - o Fecha de recidiva
  - o Fecha de progresión
  - o Fecha de último control

- Fecha de éxitus
- Variables de supervivencia
  - Supervivencia libre de enfermedad
  - Supervivencia libre de progresión
  - Supervivencia global

A dichos pacientes, previa firma de consentimiento informado, se les realizó la **extracción de sangre periférica**, en condiciones estériles, en tubos “Venoject” de 10mL con EDTA y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

Se obtuvieron un total de 276 muestras de sangre periférica, correspondientes a distintos momentos evolutivos de la enfermedad de los pacientes incluidos.

Todas las muestras fueron identificadas con su correspondiente número de laboratorio, para mantener la confidencialidad de los datos personales y genéticos, respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas. Estas muestras fueron relacionadas con las respectivas historias clínicas.

En el laboratorio 13 del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca, liderado por el Dr. Isidro Sánchez, se realizó la detección de la expresión del gen *SLUG* en sangre periférica.

Las **muestras histológicas** correspondientes al tumor de dichos pacientes, habían sido recogidas, archivadas y custodiadas por el Servicio de Anatomía Patológica, bien tras la extirpación quirúrgica, en el caso de los estadios localizados, o bien tras la técnica diagnóstica correspondiente (intervención quirúrgica/ biopsia endoscópica) en el caso de los estadios diseminados. Dichas muestras fueron conservadas en bloques de parafina y recuperadas posteriormente para los estudios de expresión de E-cadherina mediante inmunohistoquímica.

De los 168 pacientes incluidos en el estudio, en los que fue posible la determinación de *SLUG*, se pudo realizar el estudio de E-cadherina en 86. En el resto no fue posible por no disponer de material histológico correspondiente

al tumor primario en buen estado para la determinación. Las muestras histológicas habían sido obtenidas entre el año 1999 y el 2007.

Para poder estudiar a la vez la influencia de ambas variables, **SLUG** y **E-cadherina**, se creó una nueva variable combinando su expresión, dando lugar a dos grupos:

- SLUG negativo y E-cadherina positiva, que hipotéticamente serían los pacientes con mejor pronóstico.
- SLUG positivo y E-cadherina negativa, que serían los de peor pronóstico.

Los resultados obtenidos y los datos de cada paciente se almacenaron en una base de datos duplicada creada a tal efecto con los softwares informáticos "*Filemaker pro*" y "*Excel*".

## 2. TÉCNICAS DE DETECCIÓN

### 2.1. Detección de **SLUG**

En la el laboratorio 13 del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de Salamanca se realizó la obtención y almacenamiento de mRNA (ARN mensajero), cDNA (ADN complementario) y DNA genómico de las diferentes muestras de sangre periférica y el análisis molecular de las mismas.

De todas las muestras, el mRNA se obtuvo en un plazo máximo no superior a 5 horas desde su extracción. Todas las muestras permanecieron almacenadas a -70°C en criotubos eppendorf libres de RNAasa. Se utilizaron 10 µL de cDNA de cada muestra para la detección de **SLUG** por técnica de RT-PCR, y otros 10 µL como control interno para la detección de actina.



### **2.1.1. Análisis de expresión génica por RT-PCR: síntesis de DNA complementario de cadena sencilla (cDNA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El análisis de la expresión del gen *SLUG* se realizó detectando la presencia/ausencia de los mRNAs correspondientes al gen *SLUG* en la población de mRNAs de las células problema. Para la detección se sintetizaron los cDNAs de la población transcrita y se amplificaron (cuando estaban presentes) los correspondientes a *SLUG* mediante la técnica de PCR.

#### **2.1.1.1. Extracción de RNA**

La purificación del RNA de las poblaciones problema se hizo utilizando el método comercial RNAwiz™ Protocol (catalog # 9736; Ambión). Para mantener la integridad de RNA, las células se mantuvieron en solución “RNA later” (Ambión®) hasta el momento de realizar la extracción. La lisis celular se realizó con 500 µl de RNAwiz durante 5 minutos tras eliminar el “RNA later”. Posteriormente, se realizó la extracción del RNA mezclando con 100 µl de cloroformo (Merck). Tras centrifugar la mezcla, se recogió la fase acuosa sobrenadante, que contiene el RNA en solución. Posteriormente, se precipitó con un volumen de isopropanol (Merck) y ½ volumen de agua bidestilada (ddH<sub>2</sub>O) y autolavada. El RNA se lavó con etanol (Merck) al 70% y, tras una breve centrifugación de 5 minutos a 15.000 rpm, se dejó evaporar el etanol residual 10 minutos a temperatura ambiente, para disolver finalmente el RNA en (ddH<sub>2</sub>O). El RNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 (Ultrospec 1000E, Pharmacia Biotech).

#### **2.1.1.2. Tratamiento de las muestras de RNA con DNasa I**

El RNA (10 µg), extraído de las muestras a cuantificar según el método de RNA Wiz, se trató con 10 unidades (5 µl) de DNasa I libre de RNasa (HT Biotechnology) en una mezcla de reacción que contiene 10 unidades de un inhibidor de RNasa, RNasin (Promega), 5 µl de 0,1 M Tris-HCl pH=8.0 (10X), 5 µl de 0.5 KCL (10X), 5 µl de Mg<sub>2</sub>Cl 15 mM (10X) y ddH<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 50 µl. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y se extrajo con fenol y cloroformo en una proporción 3:1. Se precipitó durante 20 minutos a -70°C con una mezcla de etanol y sales en proporción 24:1. Tras

lavar con 70% de etanol se resuspendió en ddH<sub>2</sub>O. La calidad del RNA tratado se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa para RNA.

#### **2.1.1.3. Síntesis de DNA complementario de cadena sencilla (cDNA)**

El sustrato que se utilizó en la reacción de PCR para los estudios de expresión fue cDNA sintetizado a partir del RNA obtenido de las poblaciones celulares problema. Para la transcripción inversa se utilizaron 5µg del RNA total tratado con DNAasa que se desnaturalizaron durante 5 min a 65°C en presencia de 40 unidades de RNAsin (Promega). Al RNA desnaturalizado se le añadieron 0,5 µg (1µl) de oligo dT, 40 unidades más (1µl) de RNAsin, 4µl, del tampón de la enzima 5X (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 100mM KCL, 10mMMgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 500 mM dGTP, 500 mM dATP, 500 mM dTTP, 500 mM dCTP) y 21 U (1µl) de transcriptasa inversa (superRT HT Biotechnology). El cDNA así sintetizado se utilizó en las distintas reacciones de PCR.

#### **2.1.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se utilizó como molde el cDNA sintetizado. Las condiciones establecidas en el termociclador para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa fueron las siguientes:

- Para detectar el mRNA de *SLUG* se realizaron 30 ciclos de: 94°C 1 minuto, 56° C 1 minuto y 72° C 2 minutos, con los cebadores 5'GCCTCCAAAAAGCAAATA3' (sentido) y 5'CACAGTGATGGGGCTGTATG3' (antisentido) y un último ciclo de 72°C 10 minutos.
- La amplificación del transcrito de la β-actina (mRNA expresado en todas las muestras) sirvió como control interno de la presencia de cDNA en cada una de las muestras problemas a ensayar (Figura 22).

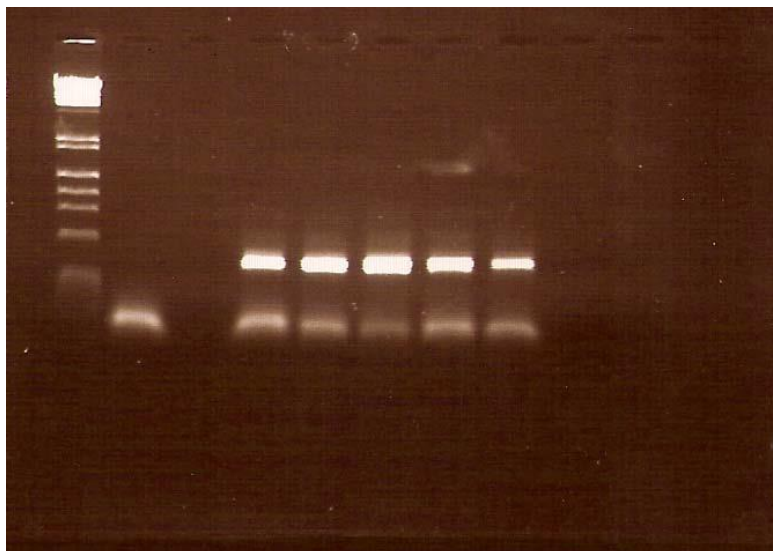


Figura 22. RT-PCR para  $\beta$ -actina

- 1: Marcador
- 2: Control negativo sin cDNA
- 3: Control negativo, sin contaminación
- 4-8: Muestras problema con cDNA

### 2.1.2. Electroforesis del DNA en geles de agarosa

Con el fin de detectar el posible producto amplificado, 20  $\mu$ l de cada muestra se corrieron en un gel de agarosa (Gibco BRL) al 1% y con 0,5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, empleando una diferencia de potencial de 50 voltios, durante una hora, y con solución tampón TBE-1X (Tris Base 90mM, ácido bórico 90mM y EDTA 2mM pH 8.0). Posteriormente, el contenido del gel se transfirió a membrana de nylon y se hibridó con las sondas internas marcadas con ( $\alpha$ - $^{32}$ P)dCTP (minisouthern) para la detección de *SLUG*: (5'-G-A-C-A-C-A-C-A-T-A-C-A-G-T-G-A-T-T-A-T-T-T-C-C-3').

Los fragmentos de DNA resultantes de la digestión fueron separados por tamaño en geles agarosa al 0,8% en tampón AGB (40 mM TRIS; 0,1% ácido acético glacial; 0,2mM Na<sub>2</sub>EDTA; 20 mM acetato de sodio). Para ello, las muestras de DNA digeridas se le añadieron 8  $\mu$ l de tampón de carga (50% glicerol; 200 mM EDTA pH:8; 0,1% azul de bromofenol). El primer pocillo de cada gel se reservó para separar, en paralelo con las muestras a estudiar, un marcador de tamaño que, en nuestro caso fue una mezcla de DNA del fago  $\lambda$  cortado con la endonucleasa Hind III (GIBCO/BRL) y del fago NX-174 cortado con la endonucleasa Hae III (GIBCO/BRL), lo que genera 19 fragmentos de

DNA de longitud conocida. Para monitorizar la migración del DNA en el gel, utilizamos dos colorantes que se incluyeron en el tampón de carga: el xylene-cianol, que en geles de agarosa al 1% migra, aproximadamente, con los fragmentos de 0,5 Kb, y el azul de bromofenol, que migra, aproximadamente, con los fragmentos de 0,5 Kb. Después de cargar las muestras en el gel, éstas se sometieron durante 14 horas a una diferencia potencial de 35 voltios.

Tras la electroforesis, el DNA se visualizó tiñendo el gel con bromuro de etidio (el gel se introdujo durante 15 minutos en 500 ml de tampón AGB con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), que actúa intercalándose entre las bases de timina del DNA y emitiendo fluorescencia al exponerse a la luz ultravioleta de longitud de onda comprendida entre 250-310 nm. Para tener una referencia de los tamaños que se buscan tras la hibridación, se fotografió el gel con una cámara Polaroid MP-40, colocando en paralelo una regla autofluorescente, lo que nos permitió establecer una relación entre la distancia de migración y el peso molecular del marcador de tamaño y, por lo tanto, conocer el tamaño correspondiente en cualquier punto del gel.

### **2.1.3. Transferencia del DNA a membranas de nylon**

Los fragmentos de DNA separados mediante electroforesis se transfirieron a membranas de *nylon* (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech). Previamente a la transferencia, los fragmentos de DNA se desnaturalizaron para obtener cadenas de DNA monocatenarias y así poder luego detectar la presencia del gen *SLUG* por hibridación con una sonda específica frente al DNA de *SLUG*. Para ello, el gel se introdujo a temperatura ambiente durante 1 hora en solución desnaturizante (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) en agitación para romper los puentes de hidrógeno entre las cadenas de DNA. Posteriormente, el gel se pasó a solución neutralizante (1,5 M NaCl; 1 M TRIS-HCL pH:8) a temperatura ambiente durante 1 hora en agitación. A continuación, el DNA se transfirió a la membrana de *nylon* utilizando como tampón de transferencia 20X SSC (6 M NaCl; 0,6 M citrato sódico dibásico pH:7). La transferencia se hizo durante 16 horas y, por último, la membrana se trató con una fuente de luz ultravioleta de 312 nm durante 20 segundos (UV Stratalinker 2400, Straagene) para unir covalentemente el DNA a la membrana de nylon.

#### 2.1.4. Hibridación con sondas de DNA frente a *SLUG*

La hibridación del DNA unido a la membrana se realizó en tres etapas:

A. *Etapas de prehibridación:* la finalidad es bloquear la hibridación no específica del DNA a la membrana. Para ello, se incubó la membrana durante 2 horas a 65°C en agitación constante en 25 ml de solución de prehibridación 3X SSC; 0,1% SDS; 1X solución de denhardt (0,2 mg/ml polivinilpirrolidona (Sigma); 0,2 mg/ml albúmina de suero bovino (Sigma); 0,2 mg/ml ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech)); 5% sulfato de dextrano y 10 mg/ml de DNA heterólogo sonificado y desnaturalizado (Sigma).

B. *Etapas de hibridación:* la finalidad es que la sonda de DNA marcado y desnaturalizado, se una a la secuencia homóloga del DNA problema. Para esto se añadió a la misma mezcla utilizada en la prehibridación una sonda de DNA, correspondiente al cDNA de *SLUG* (idéntico en más de un 90% al de *SLUG*) marcada radioactivamente mediante el método de *random primer* o cebado aleatorio. La reacción de marcaje radioactivo se llevó a cabo empleando el sistema “*Oligolabelling Kit*” (Amersham Pharmacia Biotech). Se marcaron 50 ng de DNA resuspendidos en 46 µl de agua bidestilada con 5 µl de (α-32P)dCTP (300 Ci/mmol). La reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos. Una vez marcada, la sonda se purificó mediante centrifugación a temperatura ambiente durante 5 minutos a 1.500 g. a través de columnas de Sephadex G-50, de tal manera que en la columna quedan retenidos los nucleótidos y hexanucleótidos libres, recuperándose la sonda marcada radioactivamente en la solución diluida. La eficiencia de la reacción, así como la cantidad de sonda marcada radioactivamente, se determinó en un contador de radiación β (Quixk Count 2000, Bisoscan).

La hibridación se realizó durante 16 horas a 65°C con 106 pm/ml de la sonda marcada, previamente desnaturalizada durante 5 minutos a 100°C.

C. *Lavado de la membrana:* la finalidad de esta etapa es quitar toda la sonda que se haya pegado inespecíficamente a la membrana. Para ello,

una vez hibridada, la membrana se sometió a dos lavados de 30 min a 65°C en una solución que contiene SDS y SSC. Como utilizamos una sonda de alta homología, los lavados se realizaron en condiciones altamente restrictivas (1X SSC (0,3 M NaCl; 30 mM citrato sódico dibásico pH: 7); 0,1% SDS).

#### 2.1.5. Revelado

Tras el lavado, las membranas se expusieron sobre películas de autorradiografía (Kodak-X-Omat-AR) utilizando un intensificador de la señal (Reflection<sup>TM</sup> Intensifying Screen; Dupont). La exposición se realizó durante 12-24 horas a -70°C (Figura 23).

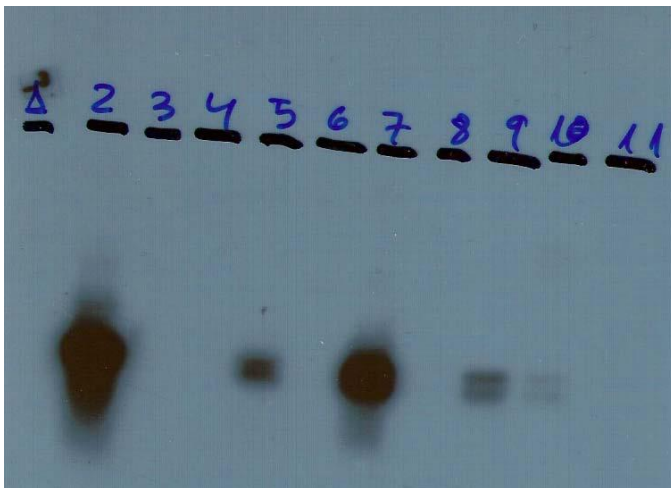


Figura 23. Revelado de muestras positivas y negativas  
2: Control positivo (línea celular K562 que expresa *SLUG*)  
4: Control negativo (sin cDNA)  
5, 7, 9 y 10: Muestras *SLUG* positivas  
6, 8, 11: Muestras *SLUG* negativas

## **2.2. Estudio de expresión de E-cadherina**

En el Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca se realizó la detección de E-Cadherina en las muestras de tejido tumoral, previamente fijadas en formol y conservadas en bloques de parafina, mediante técnicas de inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica es una técnica esencial en el diagnóstico anatomopatológico de las enfermedades, fundamentalmente de las neoplásicas. Corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. Para que la utilidad de la inmunohistoquímica sea plena es necesario realizar la fijación de los tejidos, las indicaciones de uso, las técnicas y la lectura y valoración de los resultados ateniéndose a unos criterios de controles de calidad tanto internos —del propio servicio— como externos, en nuestro caso los auspiciados por la Sociedad Española de Anatomía Patológica.

### **2.2.1. Fijación de los tejidos**

La inmunohistoquímica se realizó en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. La fase de fijación del material para inmunohistoquímica es esencial, una fijación inadecuada dificulta la interpretación.

El fijador que se utiliza para inmunohistoquímica es el formaldehído al 10% tamponado a pH 7,4 (formalina). El período ideal de fijación no debe ser menor de 24 horas ni mayor de 48 horas. En cualquier caso, los sistemas técnicos de inmunohistoquímica empleados en nuestro medio permiten interpretar resultados de forma fiable en tejidos fijados durante periodos de hasta 7 días.

Las muestras tisulares, ya fijadas en formol, se procesaron mediante el sistema técnico (procesador automático de tejidos) Leica ASP0025. El procesador de tejidos transforma los mismos en bloques de parafina, el

elemento básico de trabajo tanto para histología convencional como para inmunohistoquímica.

### **2.2.2. Métodos de recuperación antigénica**

Durante la fijación con formalina se producen puentes metilo cruzados entre las proteínas y se forman compuestos cálcicos adyacentes. Estos compuestos afectan también a las zonas antigénicas y deben eliminarse para obtener un resultado óptimo en la inmunohistoquímica.

El método de recuperación antigénica se realiza fundamentalmente mediante incubación con calor, en torno a los 100 °C, en búferes de citrato o EDTA. Menos frecuente es el uso de enzimas proteolíticas, sin calentamiento, ya que dejan un fondo mayor y favorecen el desprendimiento del tejido. La técnica utilizada por nosotros ha sido la plataforma estandarizada (semiautomática) Bond III Polymer Refine Detection (Leica), que incorpora sistemas de preservación y recuperación antigénica óptimos para el anticuerpo anti-E-cadherina utilizado en este estudio (clon EP700Y; monoclonal generado en ratón, Merck)

### **2.2.3. Evaluación del resultado inmunohistoquímico**

Se sigue en general la siguiente pauta, aunque hay frecuentes casos específicos en los que los porcentajes y su significado pueden variar:

- Negativo (-): total negatividad o menos del 50% de las células tumorales con menor intensidad que el control (mucosa no tumoral vecina).
- Positividad débil (+/-): más del 50% de las células tumorales con menor intensidad que el control.
- Positivo (+): más del 50% de las células tumorales con igual o mayor intensidad que el control.

En nuestro trabajo fue posible realizar el estudio de E-cadherina en 86 pacientes en total (entre los dos grupos, CCR localizado y metastásico en el momento de entrada en el estudio), el resto no tenían muestra histológica válida. A la hora de interpretar los resultados de la expresión de esta molécula,



hay que tener en cuenta que las muestras más antiguas estaban peor preservadas y es muy probable que esto haya dado lugar a unos resultados de expresión de E-cadherina inferiores a lo esperado. Para poder realizar subgrupos de expresión y así proceder al posterior análisis de correlación con otros factores, se realizó una adaptación de los límites habituales a la baja, considerando:

- Positividad moderada/intensa (*score* 2) cuando las muestras presentaban >50% de las células tumorales positivas (+/++) o positividad intensa en 10-50% de las células. En este grupo estarían 13 pacientes.
- Positividad baja, débil (*score* 1): 10-50% de células con positividad “+”. En este grupo estarían 20 pacientes de nuestro estudio) o <10% de células con “++” (ningún paciente en nuestro estudio)
- Positividad muy baja, muy débil o nula (*score* 0): sin expresión de E-cadherina o “+” en <10%de las células. En este grupo estarían 53 pacientes.

Como se puede observar, incluso tras la adaptación de la interpretación de la inmunohistoquímica de E-cadherina, seguimos teniendo la mayoría de pacientes en un grupo de muy baja expresión. Por este motivo, se decidió agrupar a los pacientes con *score* 1 y 2 (33 pacientes) para poder realizar análisis posteriores de asociación, etc.

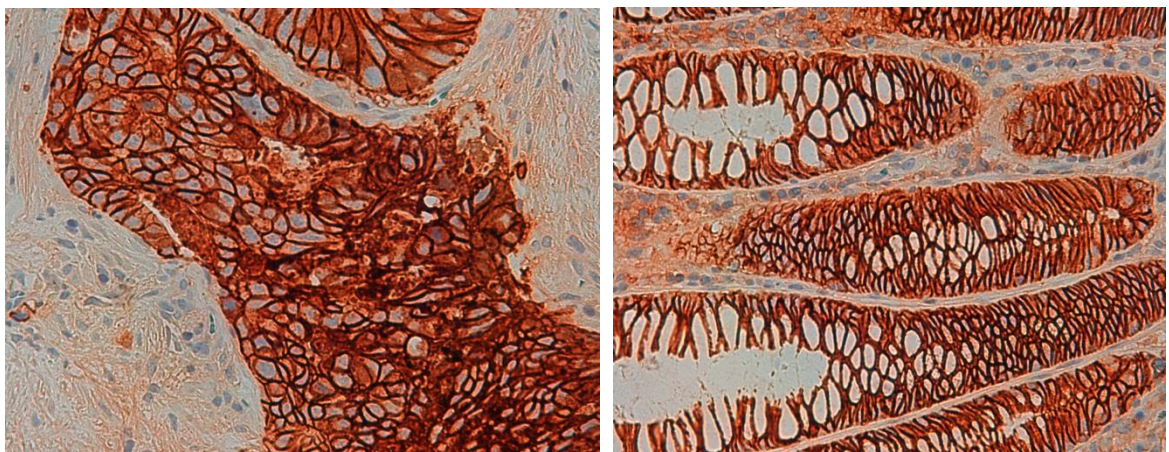


Figura 24. Inmunohistoquímica de E-cadherina. Expresión intensa, de membrana.

### 3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el análisis y conseguir los objetivos marcados, se dividió a los pacientes en dos grupos, según la extensión de la enfermedad en el momento de entrada en el estudio: localizada o metastásica.

En primer lugar, se realizó un análisis estadístico **descriptivo** para conocer las características de los sujetos a estudio, así como las diferentes variables cuantitativas y cualitativas con significación pronóstica en los pacientes con cáncer de colon locorregional y metastásico. Para las variables cuantitativas se calcularon la media, la mediana y la desviación típica. En el caso de las variables categóricas nominales y ordinales se calculó la proporción de pacientes en cada categoría.

Después, mediante estadística **comparativa** (test de Chi Cuadrado y regresión logística) se realizó un estudio de correlación con la expresión de *SLUG* en sangre periférica y con la expresión de E-cadherina:

Para valorar si existía asociación entre las variables a estudio (expresión de *SLUG* y de E-cadherina) y otras variables clínico-patológicas de importancia clínica reconocida, así como para analizar si existía asociación entre las dos variables a estudio, se realizaron **tablas de contingencia**, conteniendo las frecuencias de cada variable según la característica estudiada. Para determinar si las diferencias en la distribución entre los grupos eran estadísticamente significativas, y no se debían simplemente al azar, se realizó la prueba de **chi-cuadrado** ( $\chi^2$ ).

Para poder conocer la magnitud del riesgo que cada variable estudiada aportaba, se realizó un modelo de **regresión logística** binaria, que nos da la *Odds Ratio* (OR) y su intervalo de confianza (IC) del 95%

En el **análisis de supervivencia**, para los pacientes con cáncer de colon locorregional se estudió la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la

supervivencia global (SG) y para los pacientes con cáncer de colon metastático se analizó la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG). La SLE se expresó en meses, desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recidiva o fin del seguimiento. La SLP, también en meses, desde la fecha de recidiva o diagnóstico de metástasis hasta la fecha de progresión o fin del seguimiento. La SG, igualmente en meses, desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de muerte o fin del seguimiento.

Mediante el **método de Kaplan-Meier** se obtuvieron las medianas de supervivencia con sus correspondientes IC del 95%, así como las diferentes curvas de supervivencia. Para valorar si las diferencias observadas entre los diferentes grupos eran estadísticamente significativas se realizó el test de log-rank.

Se utilizó un modelo de **regresión de Cox** o de riesgo proporcional para poder calcular la magnitud del riesgo que aporta cada variable, mediante las *Hazard Ratio* (HR) y sus IC del 95%.

En los intervalos de confianza del 95%, tanto de los OR como de los HR, aquellos IC que no contienen el 1 indican que el resultado es estadísticamente significativo, es decir, que esa variable aumenta (OR o HR >1) o disminuye (OR o HR <1), de una manera significativa, el riesgo.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago IL, Estados Unidos). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor asociado a la prueba estadística era menor a 0,05.



# RESULTADOS



# RESULTADOS

## 1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

Estudiamos un total de 168 casos de cáncer colorrectal, de los que 95 tenían enfermedad localizada y 73 enfermedad avanzada en el momento de entrada en el estudio.

En la figura 25 se muestra el diagrama de flujo. Tras valorar las muestras disponibles de cada paciente, para homogeneizar la muestra y poder extraer conclusiones, se procedió de la siguiente manera:

- De los 95 pacientes con estadio localizado (I-III):
  - Para el análisis estadístico nos quedamos con los 80 pacientes en los que se obtuvo la muestra al iniciar la adyuvancia o en los que se programó seguimiento (por no tener indicación de tratamiento adyuvante)
  - Excluimos los 5 pacientes en los que la 1ª muestra se extrajo durante la adyuvancia y los 10 pacientes en los que la 1ª muestra correspondía al final de la adyuvancia.
- De los 73 pacientes con enfermedad metastásica:
  - Para el análisis estadístico seleccionamos los 68 en los que la extracción de la muestra se realizó en un momento en el que la enfermedad estaba en progresión.
  - Excluimos 4 pacientes que estaban en respuesta completa tras resección completa de las metástasis y un paciente en el que la extracción se realizó en respuesta a quimioterapia.

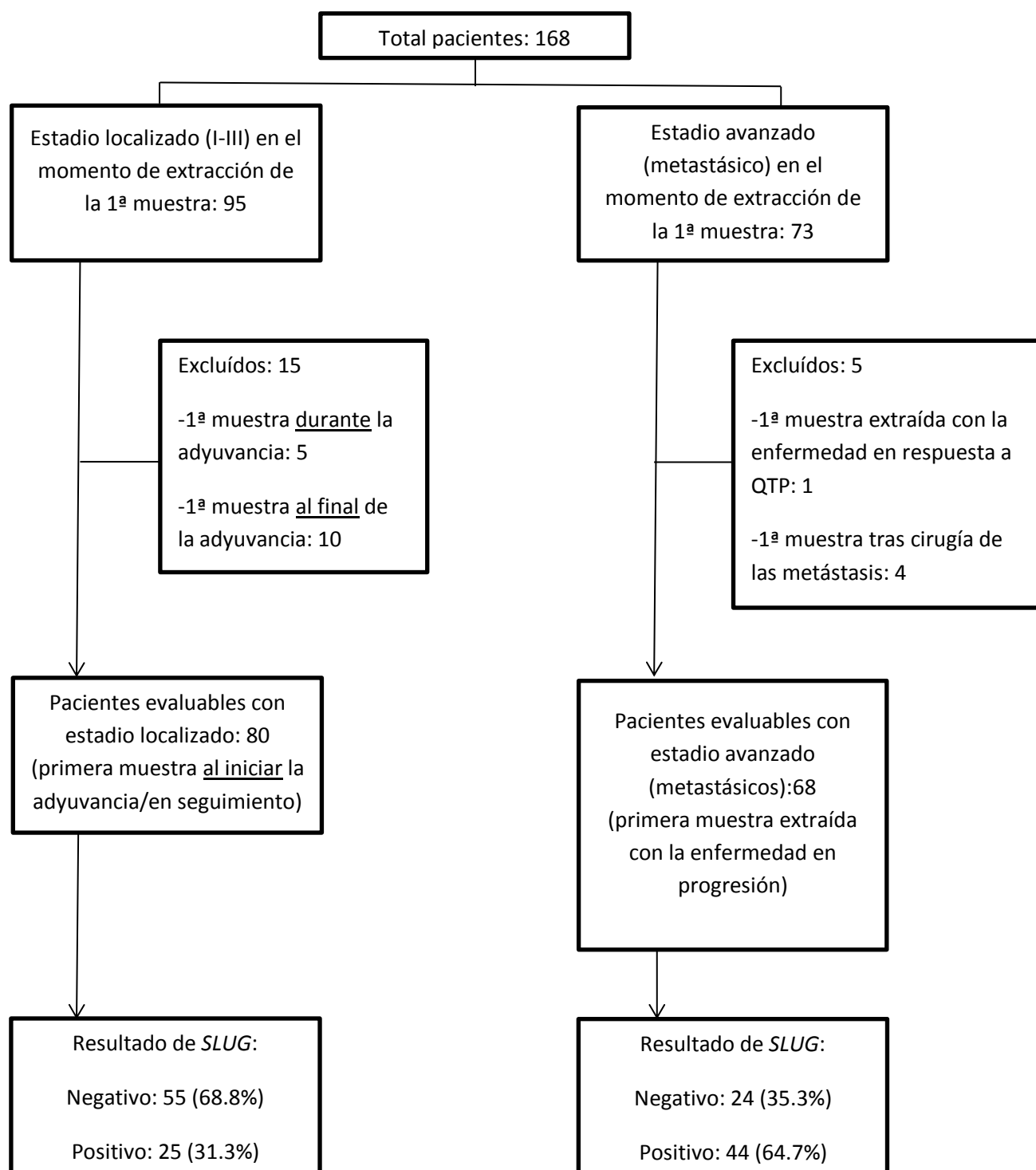


Figura 25. Diagrama de flujo.



En cuanto al estudio de **E-cadherina**, éste fue posible realizarlo en 86 pacientes en total (entre los dos grupos, CCR localizado y metastásico en el momento de entrada en el estudio), el resto no tenían muestra histológica válida. Siguiendo las premisas expuestas en “Material y Métodos”, los resultados de la determinación de E-cadherina son los recogidos en la siguiente tabla.

Expresión		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
E-cadherina	No disponible	82	48,8	48,8	48,8
	score0/nula o muy débil	53	31,5	31,5	80,4
	score1/débil	20	11,9	11,9	92,3
	score2/moderada o fuerte	13	7,7	7,7	100,0
	Total	168	100,0	100,0	

Tabla 3. Resultados de la determinación de la expresión de E-cadherina en el total de pacientes del estudio.

Como se ha comentado previamente, la mayoría de pacientes están en el grupo de muy baja expresión. Por este motivo, se decidió agrupar a los pacientes con *score* 1 y 2 (33 pacientes) para poder realizar análisis posteriores de asociación, etc.

## 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON CCR LOCALIZADO

### 2.1. Características clínicas de los pacientes con CCR localizado

Como se refleja en la tabla 4, se estudiaron 80 pacientes con CCR localizado, con una mediana de **edad** de 67 años. En el momento del diagnóstico, el paciente más joven tenía 32 años, y el de mayor edad 85.

El **género** mayoritario fue el masculino, con 47 varones (58,8%), frente a 33 mujeres (41,3%).

En 53 de estos pacientes estaba disponible el valor de **CEA** al diagnóstico, siendo éste elevado (>5 ng/mL) en 26 de ellos y normal en los 27 restantes.

En cuanto al **tipo histológico**, todos los tumores analizados eran adenocarcinomas.

De estos 80 pacientes, disponíamos de datos sobre el **grado** histológico en 64, un 80% de los casos. La distribución según esta variable era la siguiente: Grado 1 (tumores bien diferenciados) en 24 pacientes (30,0%); grado 2 (moderadamente diferenciados) en 38 pacientes (47,5%) y grado 3 (pobremente diferenciados) en 2 pacientes (2,5%). Por tanto, se observa que una minoría de tumores fueron clasificados como alto grado.

En cuanto al **estadio inicial** de la enfermedad: 41 (51,3%) presentaban estadio III, siendo éste el más frecuente. El segundo estadio en frecuencia fue el II (37 pacientes, un 46,3 %) y el más infrecuente el estadio I (2 pacientes, un 2,5%)

Variable		N (%) (% de conocidos)
Edad	Media (años)	64,89
	Mediana (años)	67
	Rango (años)	32-85
Sexo	Hombre	47 (58,8)
	Mujer	33(41,3)
CEA	≤5 ng/mL	27(33,8) (50,9)
	>5 ng/mL	26 (32,5) (49,1)
	Desconocido	27 (33,8)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	80 (100)
Grado histológico	1	24 (30,0) (37,5)
	2	38 (47,5) (59,4)
	3	2 (2,5) (3,1)
	Desconocido	16 (20,0)
Estadio	I	2 (2,5)
	II	37 (46,3)
	III	41 (51,3)
Tratamiento adyuvante	5-FU+Isovorín	26 (32,5)
	Fluoropirimidina oral	22 (27,5)
	XELOX	26 (32,5)

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes con CCR localizado.

Recibieron **tratamiento adyuvante**, según protocolo, 74 pacientes y el tipo de quimioterapia administrada fue:

- En 26 pacientes (32,5%) 5-FU e isovorín
- En 22 (27,5%) una fluoropirimidina oral (tegafur o capecitabina)
- En otros 26 (32,5%) la combinación de oxaliplatino y capecitabina (XELOX)

## 2.2. Resultados de la determinación de *SLUG* en los pacientes con CCR localizado

De las 80 muestras iniciales para estudiar *SLUG*, el resultado fue negativo en esa primera muestra en 55 de ellos (68,8%) y positivo en el resto (25 pacientes, un 31,3%). Se observa por tanto que es mayor el porcentaje de pacientes con *SLUG* negativo (Tabla 5).

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
SLUG	Negativo	55	68,8	68,8	68,8
	Positivo	25	31,3	31,3	100,0
	Total	80	100,0	100,0	

Tabla 5. Resultados de la 1ª determinación de *SLUG* en los pacientes con CCR localizado.

De 52 pacientes se obtuvo una **segunda muestra** para estudiar *SLUG*, al final del tratamiento adyuvante (Tabla 6), resultando negativas 42 (52,5% del total de pacientes con CCR localizado; 80,8% de los pacientes en los que se realizó una 2ª extracción) y positivas 10 (12,5% de total de pacientes con CCR localizado; 19,2% de los pacientes con 2ª extracción).

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
2º SLUG	Negativo	42	52,5	80,8	80,8
	Positivo	10	12,5	19,2	100,0
	Total	52	65,0	100,0	
	No disponible	28	35,0		
	Total	80	100,0		

Tabla 6. Resultados de la 2ª determinación de *SLUG* en sangre periférica, incluyendo el total de pacientes con CCR localizado.

Al estudiar la correlación entre el resultado de *SLUG* de la 1ª muestra y de la 2ª, se observa lo siguiente:

- De los 39 pacientes con CCR localizado que tienen *SLUG* negativo en la 1ª determinación y que tienen una 2ª determinación: mantienen el resultado de *SLUG* negativo la mayoría (35 pacientes; 63,6%) y en 4 de ellos *SLUG* se positiviza (4 pacientes; 7,3%)
- Hay 13 pacientes con *SLUG* positivo en la 1ª determinación que tienen una 2ª determinación, de ellos: En 6 (46,2%) *SLUG* permanece positivo y en 7 (53,8%) *SLUG* se negativiza tras el tratamiento adyuvante.

### 2.3. Resultados de la determinación de E-cadherina en los pacientes con CCR localizado.

En cuanto a los resultados de la determinación de E-cadherina en los pacientes con CCR localizado, fue posible su estudio en 43 pacientes (53,7%), con los siguientes resultados (Tabla 7):

- E-cadherina “positiva” (score 1/débil o 2/moderada o fuerte) en 22 pacientes (51,2%)
- E-cadherina “negativa” (score 0 /nula o muy débil) en 21 pacientes (48,8%)

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
E-cadh	Score 1/2	22	27,5	51,2	51,2
	Score 0	21	26,3	48,8	100,0
	Total	43	53,8	100,0	
No disponible		37	46,3		
Total		80	100,0		

Tabla 7. Resultados de la determinación de la expresión de E-cadherina en los pacientes con CCR localizado.

## 2.4. Resultados del seguimiento de los pacientes con CCR localizado.

Los principales datos obtenidos en el **seguimiento** de los pacientes con CCR localizado incluidos en este estudio se resumen en la tabla 8 (recidivas y exitus).

Variable		N (%)
Recidiva	No	55 (68,8)
	Sí	25 (31,3)
Exitus	No	44 (55,0)
	Sí	36 (45,0)
	Por CCR	25 (69,4 % de las muertes; 31,3% del total)
	Por otra causa	11 (30,6% de las muertes; 13,7% del total)

Tabla 8. Recidivas y exitus en los pacientes con CCR localizado.

De los 80 pacientes con estadios I-II, con una **mediana de seguimiento** de 130,7 meses: han presentado **recidiva** de la enfermedad 25 pacientes (31,3%) y 55 (68,8%) han permanecido libres de enfermedad hasta la finalización de seguimiento de nuestro estudio. Al final del estudio siguen vivos 44 pacientes (55%) y han fallecido 36 (45%). Hay que destacar que de los exitus 11 han sido por otras causas distintas al CCR, por lo que realmente la mortalidad causa-específica es del 31,3% (corresponde a los 25 pacientes que presentaron recidiva de la enfermedad y que fallecieron por esa causa).

En este grupo de pacientes no se ha alcanzado la mediana de supervivencia libre de enfermedad ni de supervivencia global, como se observa en los siguientes gráficos (Figuras 26-28)

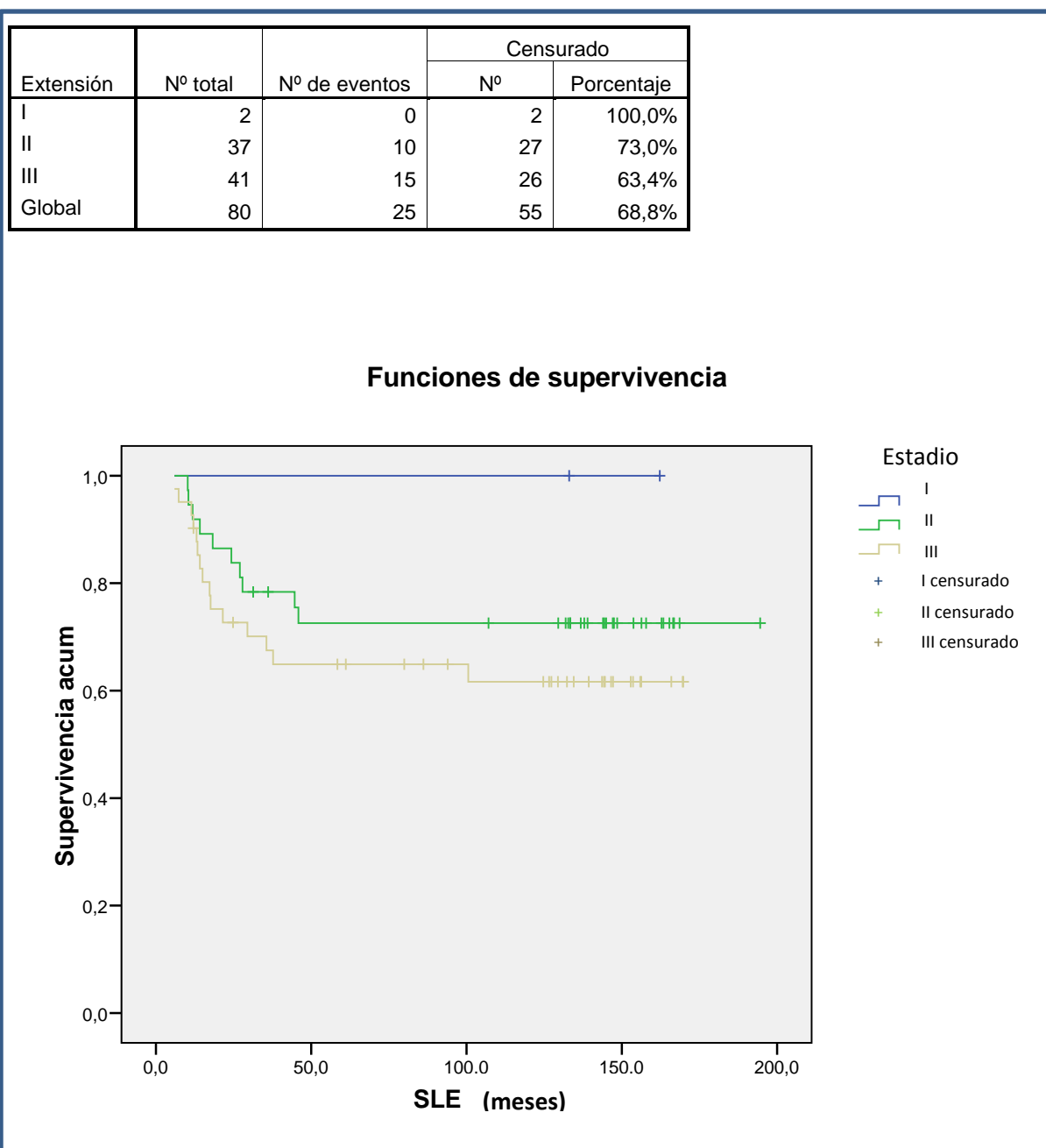


Figura 26. Supervivencia libre de enfermedad por estadio en los pacientes con CCR localizado.

Estadio	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
I	2	0	2	100,0%
II	37	14	23	62,2%
III	41	22	19	46,3%
Global	80	36	44	55,0%

### Funciones de supervivencia

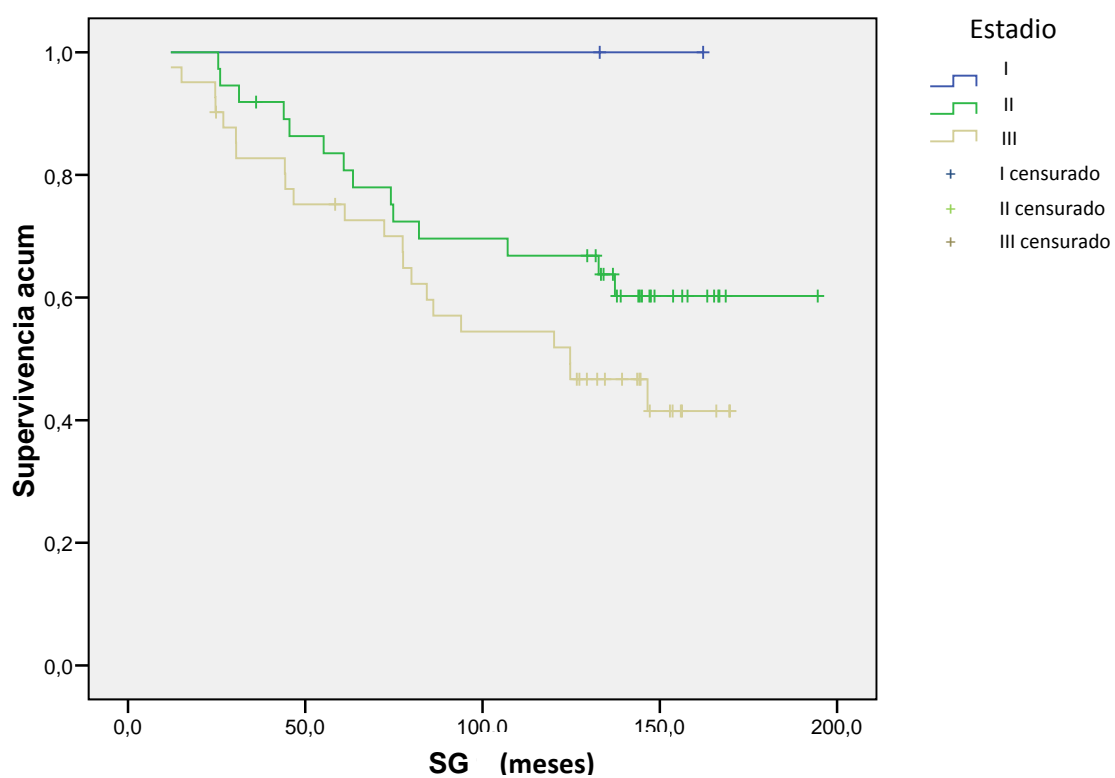


Figura 27. Supervivencia global por estadio en los pacientes con CCR localizado.

Estadio	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
I	2	0	2	100,0%
II	37	10	27	73,0%
III	41	15	26	63,4%
Global	80	25	55	68,8%

### Funciones de supervivencia

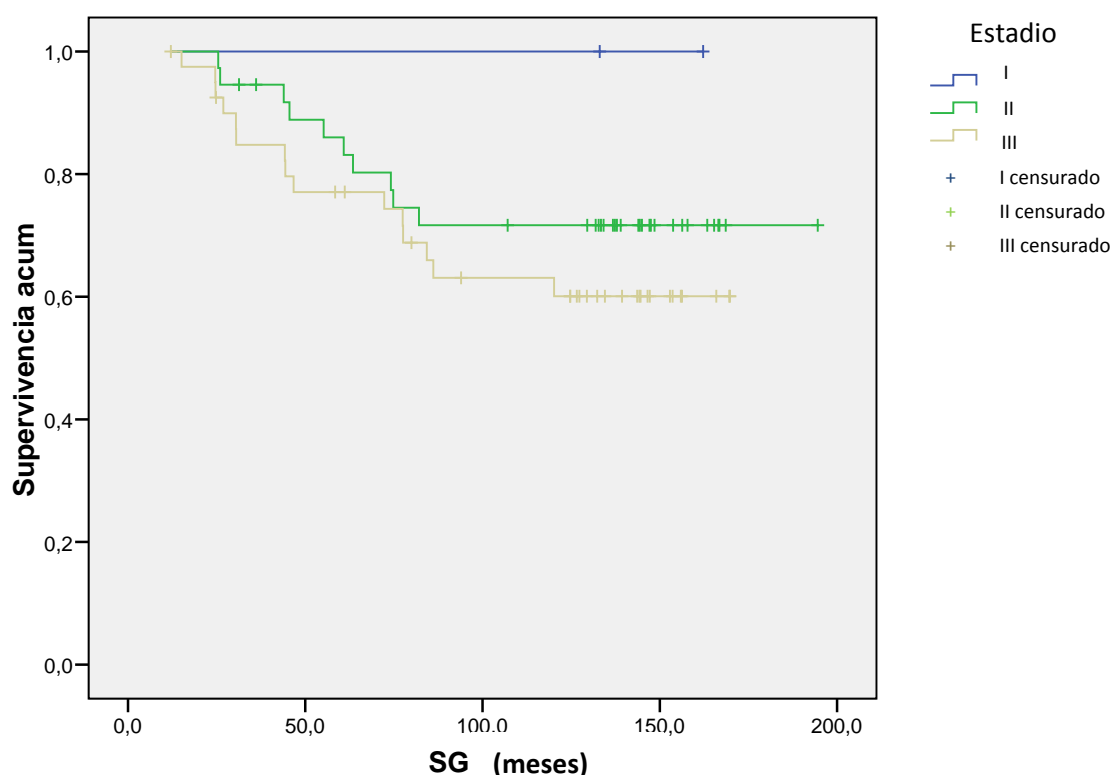


Figura 28. Supervivencia global por estadio en los pacientes con CCR localizado, teniendo en cuenta la mortalidad causa-específica.



### 3. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON CCR METASTÁSICO

#### 3.1. Características clínicas de los pacientes con CCR metastásico

En la tabla 9 se describen las características demográficas de estos pacientes.

Se estudiaron 68 pacientes con CCR avanzado, con una mediana de **edad** de 63 años. El paciente más joven tenía 36 años y el mayor 85.

En este caso el **género** mayoritario también fue el masculino, con 46 varones (67,6%), frente a 22 mujeres (32,4%).

Edad	Media (años)	63,36
	Mediana (años)	63
	Rango (años)	36-85
Sexo	Hombre	46 (67,6%)
	Mujer	22 (32,4%)

Tabla 9. Características demográficas de los pacientes con CCR avanzado.

Al igual que en los casos localizados, el **tipo histológico** de todos los tumores analizados fue adenocarcinoma.

Las **localizaciones** en las que los pacientes presentaban metástasis quedan reflejadas en la tabla 10. El hígado fue el asiento más frecuente de lesiones secundarias, seguido de la afectación “locorregional”, en la que se incluían estructuras en la zona del tumor primario, como asas intestinales, afectación de pared abdominal e implantes peritoneales adyacentes a la tumoración primitiva (todos estos casos eran metástasis o recidivas consideradas irresecables).

Localización/órgano	Nº pacientes (%)
Hígado	41 (60,3)
Locorregional*	20 (29,4)
Carcinomatosis peritoneal generalizada*	6 (8,8)
Pulmón	16 (23,5)
Ganglios a distancia	3 (4,4)
Hueso	1 (1,5)
Otras	4 (5,9)

Tabla 10. Localización de las metástasis. \*La localización denominada "locorregional" incluiría pacientes con carcinomatosis peritoneal (la afectación nodular peritoneal próxima al tumor primario se había recogido en la base de datos como locorregional)

En la tabla 11 se recoge el **número de localizaciones** en las que los pacientes presentaban metástasis. Aproximadamente 2/3 de los pacientes presentaban las metástasis en una única localización (46 pacientes; 67,6%) y casi 1/3 de ellos en dos localizaciones u órganos distintos.

Nº localizaciones metastásicas	Nº pacientes (%)
1	46 (67,6)
2	21 (30,9)
3	1 (1,5)

Tabla 11. Número de localizaciones metastásicas.

También se analizó el **número de líneas de tratamiento** que había recibido cada paciente en el momento de la primera extracción para determinar *SLUG*. Más de la mitad de los enfermos se encontraban en su primera línea de tratamiento (41 pacientes; 60,3%), tan sólo 8 (11,8%) en la 2ª línea y 19 (27,9%) en líneas posteriores, como se expone en la tabla 12. La media de líneas de tratamiento recibidas en el momento de la primera extracción de *SLUG* en estos pacientes fue de 1,78 y la mediana fue 1 (Tabla 13).

Nº de líneas de tratamiento	Nº pacientes (%)
1	41 (60,3)
2	8 (11,8)
3	14 (20,6)
4	4 (5,9)
6	1 (1,5)

Tabla 12. Número de líneas de tratamiento al entrar en el estudio.

N	Válidos	68
	Perdidos	0
Media		1,78
Mediana		1,00
Mínimo		1
Máximo		6

Tabla 13. Estadística descriptiva líneas de tratamiento recibidas.

### 3.2. Resultados de la determinación de *SLUG* en los pacientes con CCR metastásico

De las 68 muestras iniciales para estudiar *SLUG* en los pacientes con enfermedad metastásica, el resultado fue positivo en 44 de ellos (64,7%) y negativo en el resto (24 pacientes, un 35,3%). Se observa por tanto que es mayor el porcentaje de pacientes con *SLUG* positivo, al contrario de lo que ocurría en los pacientes con enfermedad localizada.

### 3.3. Resultados de supervivencia en los pacientes con CCR metastásico.

La mediana de seguimiento de estos pacientes ha sido de 20,2 meses. Todos los pacientes con CCR avanzado que se incluyeron en el estudio han fallecido durante el seguimiento. En la tabla 14 se exponen los datos de supervivencia.

Variable		Meses
SLP	Media	7,7
	Mediana	5,0
	Rango	0,0-46,0
	Desviación típica	7,8
SG	Media	47,0
	Mediana	38,6
	Rango	4,7-171,5
	Desviación típica	37,7

Tabla 14. Supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) en los pacientes con CCR avanzado incluidos en el estudio.

## 4. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *SLUG* CON LA EXTENSIÓN TUMORAL

**4.1.** Al estudiar la posible asociación entre la expresión de *SLUG* en la 1ª muestra de sangre periférica y la extensión tumoral en ese momento, se observa:

Tabla de contingencia Extensión\**SLUG*1:

			<i>SLUG</i> 1		
			Negativo	Positivo	Total
Extensión	Sin enfermedad (E.I-III resecados)	Recuento	<b>55</b>	<b>25</b>	80
		% de <i>SLUG</i>	69,6%	36,2%	54,1%
	Metastásica	Recuento	<b>24</b>	<b>44</b>	68
		% de <i>SLUG</i>	30,4%	63,8%	45,9%
Total		Recuento	79	69	148
		% de <i>SLUG</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	16,532(a)	1	<b>,000</b>
N de casos válidos	168		

a 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 31,70.

Como  $p < 0,05$  el resultado es **significativo**, es decir, rechazamos la hipótesis nula de independencia y por lo tanto concluimos que ambas variables

estudiadas son dependientes, **existe una relación entre ellas**. Esto significa que existe menos de un 5% de probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta en nuestra población.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Metastásica	1,395	,350	15,867	1	,000	4,033	2,031	8,011
Constante	-,788	,241	10,685	1	,001	,455		

El resultado es **estadísticamente significativo**. En este caso el valor  $OR > 1$  indica que **el tener enfermedad metastásica se asocia a mayor probabilidad de SLUG positivo**, respecto a tener enfermedad localizada.

**4.2.** Al estudiar la posible relación entre la expresión de *SLUG* en la 2ª muestra de sangre periférica y la extensión tumoral en ese momento, se observa:

Tabla de contingencia Extensión2\**SLUG*2:

			<i>SLUG</i> 2		
			neg	posit	Total
Extensión2	Sin enfermedad (E.I-II resecados)	Recuento	38	9	47
		% de <i>SLUG</i> 2	62,3%	39,1%	56,0%
	Metastásica	Recuento	23	14	37
		% de <i>SLUG</i> 2	37,7%	60,9%	44,0%
Total		Recuento	69	61	130
		% de <i>SLUG</i> 2	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,637 (a)	1	,057
N de casos válidos	94		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 10,64.

El resultado no alcanza la significación estadística en este caso.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Metastásica	,944	,502	3,531	1	<b>,060</b>	<b>2,570</b>	,960	6,879
Constante	-,502	,264	3,612	1	,057	,605		

Estos resultados orientan a pensar que el tener extensión metastásica de la enfermedad en el momento de la 2ª extracción también aumenta la posibilidad de tener un resultado positivo de *SLUG* en esa muestra, pero no son estadísticamente significativos, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

## 5. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *SLUG* CON OTRAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE IMPORTANCIA PRONÓSTICA RECONOCIDA EN LOS PACIENTES CON CCR LOCALIZADO.

De las 80 muestras iniciales de pacientes con CCR localizado para estudiar *SLUG*, el resultado fue negativo en esa primera muestra en 55 de ellos (68,8%) y positivo en el resto (25 pacientes, un 31,3%). Si analizamos estos datos en función de otras variables clínico-patológicas, los resultados obtenidos son los siguientes:

### 5.1. Relación de la expresión de *SLUG* con el valor de CEA en los pacientes con CCR localizado.

Al estudiar la posible relación entre la expresión de *SLUG* en sangre periférica y el valor de CEA, en los pacientes con CCR localizado los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla de contingencia CEA\**SLUG*:

			<i>SLUG</i>		
			Negativo	Positivo	Total
CEA	≤5ng/mL	Recuento	17	10	27
		% de <i>SLUG</i>	50,0%	52,6%	50,9%
	>5ng/mL	Recuento	17	9	26
		% de <i>SLUG</i>	50,0%	47,4%	49,1%
Total		Recuento	34	19	53
		% de <i>SLUG</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,034(a)	1	<b>,854</b>
N de casos válidos	117		

a. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,32.

Como  $p > 0,05$  el resultado no es significativo, es decir, aceptamos la hipótesis nula de independencia y por lo tanto concluimos que ambas variables estudiadas son independientes, no existe relación entre ellas. Esto significa que existe más de un 5% de probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta en nuestra población y lo consideramos suficiente para aceptar.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
CEA >5 ng/mL	-,105	,573	,034	1	<b>,854</b>	<b>,900</b>	,293	2,769
Constante	,531	,399	1,773	1	,183	,588		

El hecho de que  $OR < 1$ , indicaría que el tener un valor de CEA elevado disminuiría la probabilidad de tener un resultado de *SLUG* negativo. Como los resultados no son estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ; I.C. incluye el 1) no podemos hacer dicha afirmación, ya que los resultados podrían deberse al azar.

## 5.2. Relación de la expresión de *SLUG* con el grado en pacientes con CCR localizado.

Al analizar la posible asociación entre el grado histológico y la expresión de *SLUG*, seleccionando los pacientes con estadio locoregional, los resultados no son estadísticamente significativos, como se refleja a continuación:

Tabla de contingencia Grado\**SLUG* en estadios I-III:

			<i>SLUG</i>		Total
			Negativo	Positivo	
Grado 1	Recuento		19	5	24
	% de <i>SLUG</i>		34,5%	20,0%	30,0%
2	Recuento		27	11	38
	% de <i>SLUG</i>		49,1%	44,0%	47,5%
3	Recuento		2	0	2
	% de <i>SLUG</i>		3,6%	,0%	2,5%
Desc.	Recuento		7	9	16
	% de <i>SLUG</i>		12,7%	36,0%	20,0%
Total	Recuento		55	25	80
	% de <i>SLUG</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,870(a)	3	,076
N de casos válidos	80		

a. 2 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,63.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Grado1			5,459	3	,141			
Grado2	,437	,617	,502	1	,479	1,548	,462	5,187
Grado3	-19,868	28420,72	,000	1	,999	,000	,000	.
Grado desc	1,586	,712	4,967	1	,026	4,886	1,211	19,714
Constante	-1,335	,503	7,055	1	,008	,263		



Teniendo en cuenta la baja frecuencia de tumores grado 3 registrados, se realizó otro análisis, agrupando a los pacientes con tumores grado 2 y grado 3, para analizar si existían diferencias respecto a los de grado 1 en cuanto a la expresión de *SLUG*, pero tampoco se encontró correlación entre el grado y *SLUG*, como se muestra en los resultados siguientes:

Tabla de contingencia Grado 1 vs 2-3\**SLUG*:

			<i>SLUG</i>		Total
			Negativo	Positivo	
Grado	1	Recuento	19	5	24
		% de <i>SLUG</i>	39,6%	31,3%	37,5%
	2-3	Recuento	29	11	40
		% de <i>SLUG</i>	60,4%	68,8%	62,5%
Total		Recuento	48	16	64
		% de <i>SLUG</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,356(a)	3	,551
N de casos válidos	64		

a.0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,00

### 5.3. Relación de la expresión de *SLUG* con el estadio en pacientes con CCR localizado.

Al estudiar la posible correlación entre la expresión de *SLUG* en la 1ª muestra de sangre periférica y la extensión tumoral en ese momento, se observa:

Tabla de contingencia Extensión\**SLUG*1:

			<i>SLUG</i>		Total
			Negativo	Positivo	
Est. I	Recuento		2	0	2
	% de <i>SLUG</i>		3,6%	,0%	2,5%
II	Recuento		24	13	37
	% de <i>SLUG</i>		43,6%	52,0%	46,3%
III	Recuento		29	12	41
	% de <i>SLUG</i>		52,7%	48,0%	51,3%
Total	Recuento		55	25	80
	% de <i>SLUG</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,244(a)	1	,537
N de casos válidos	80		

a 2 casillas (33,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,63.

Como  $p > 0,05$  el resultado no es significativo, es decir, aceptamos la hipótesis nula de independencia y por lo tanto concluimos que ambas variables estudiadas son independientes.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Estadio I			,307	2	,858			
Estadio II	20,590	28421,185	,000	1	,999	875055923,855	,000	.
Estadio III	20,321	28421,185	,000	1	,999	668477734,934	,000	.
Constante	-21,203	28421,185	,000	1	,999	,000		

Se realizó otro análisis, **agrupando los pacientes con estadio I y II**, para estudiar si había diferencias respecto al estadio III en cuanto a la expresión de *SLUG*, pero los resultados obtenidos tampoco fueron significativos:

Tabla de contingencia Estadios I y II vs II\*SLUG:

			SLUG		Total
			Neg	Pos	
Estadio	I-II	Recuento	26	13	39
		% de SLUG	47,3%	52,0%	48,8%
	III	Recuento	29	12	41
		% de SLUG	52,7%	48,0%	51,3%
Total	Recuento		55	25	80
	% de SLUG		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,154(a)	1	,695
N de casos válidos	80		

a.0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 12,19.

## 6. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE E-CADHERINA CON OTRAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE IMPORTANCIA PRONÓSTICA RECONOCIDA EN LOS PACIENTES CON CCR LOCALIZADO.

### 6.1. Relación de E-cadherina con el valor de CEA.

Al analizar la posible relación entre la expresión de E-cadherina con el valor de CEA los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla de contingencia CEA\*E-cadherina:

			E-cadherina		Total
			Negativa	Positiva	
CEA	≤5ng/mL	Recuento	10	6	16
		% de E-cadh	58,8%	50,0%	55,2%
	>5ng/dL	Recuento	7	6	13
		% de E-cadh	41,2%	50,0%	44,8%
Total	Recuento		17	12	29
	% de E-cadh		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,221 (a)	1	,638
N de casos válidos	29		

a.0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5,38.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
E-cadh pos	,357	,759	,221	1	,638	1,429	,323	6,324
Constante	-,357	,493	,524	1	,469	,700		

Con estos resultados no podemos considerar que exista una relación entre el valor de CEA y la expresión de E-cadherina.

## 6.2. Relación de E-cadherina con el grado tumoral.

Al estudiar la posible relación entre la expresión de E-cadherina y el grado tumoral estos son los resultados:

Tabla de contingencia Grado\*E-cadherina:

			E-cadherina		Total
			Score0	Score1-2	
Grado 1	Recuento		5	11	16
	% de E-cadh		22,7%	52,4%	37,2%
2	Recuento		9	5	14
	% de E-cadh		40,9%	23,8%	32,6%
3	Recuento		2	0	2
	% de E-cadh		9,1%	,0%	4,7%
Desc.	Recuento		6	5	11
	% de E-cadh		27,3%	23,8%	25,6%
Total	Recuento		22	21	43
	% de E-cadh		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	5,463 (a)	3	,141
N de casos válidos	43		

a2 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,98

Por la misma razón que se explicó en el apartado de *SLUG* (baja frecuencia de tumores con grado 3) se realizó otro análisis, agrupando a los pacientes que presentaban tumores grado 2 y grado 3 y **en este caso sí se encontraron resultados estadísticamente significativos**:

Tabla de contingencia Grado 1 vs 2-3\*E-cadherina:

			E-cadherina		Total
			Score0	Score1-2	
Grado	1	Recuento	5	11	16
		% de E-cadh	31,3%	68,8%	50,0%
	2-3	Recuento	11	5	16
		% de E-cadh	68,8%	31,3%	50,0%
Total		Recuento	16	16	32
		% de E-cadh	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,500 (a)	1	<b>,034</b>
N de casos válidos	43		

a.0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 8,00.

Con estos resultados podemos afirmar que existe una relación entre la expresión de E-cadherina y el grado del tumor, considerando agrupados los grados 2-3.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
E-cadh pos	-1,577	,763	4,274	1	<b>,039</b>	<b>,207</b>	,046	,921
Constante	,788	,539	2,137	1	,144	2,200		

**La expresión de E-cadherina (score 1) disminuye la posibilidad de que el tumor tenga grado 2-3.**

Visto de otro modo (variable dependiente E-cadherina):

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Grado 2-3	-1,577	,763	4,274	1	,039	,207	,046	,921
Constante	,788	,539	2,137	1	,144	2,200		

**El tener un tumor grado 2-3 disminuye la posibilidad de tener E-cadherina positiva (score 1) respecto a los tumores grado 1.**

### 6.3. Relación de E-cadherina con el estadio tumoral.

A continuación se exponen los resultados del análisis de la relación entre la expresión de E-cadherina y el estadio:

Tabla de contingencia Estadio\*E-cadherina:

			E-cadherina		Total
			Score0	Score1-2	
Est. I	Recuento		0	1	1
	% de E-cadh		0%	4,5%	2,3%
II	Recuento		10	9	19
	% de E-cadh		47,6%	40,9%	44,2%
III	Recuento		11	12	23
	% de E-cadh		52,4%	54,5%	53,5%
Total	Recuento		21	22	43
	% de E-cadh		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,073 (a)	2	,585
N de casos válidos	43		

a2 casillas (33,3%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,49.

Ante estos datos, no podemos afirmar que exista una correlación entre la expresión de E-cadherina y el estadio tumoral.

Al igual que en el análisis de *SLUG*, también se estudió la expresión de E-cadherina agrupando a los pacientes con estadios I y II, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al estadio III.

Tabla de contingencia Estadio I-II vs III\*E-cadherina:

			E-cadherina		
			Score0	Score1-2	Total
Estadio	I-II	Recuento	10	10	20
		% de E-cadh	47,6%	45,5%	46,5%
	III	Recuento	11	12	23
		% de E-cadh	52,4%	54,5%	53,5%
Total		Recuento	21	22	43
		% de E-cadh	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,020 (a)	1	,887
N de casos válidos	43		

a.0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,77.

## 7. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE *SLUG* EN SANGRE PERIFÉRICA Y DE E-CADHERINA EN TEJIDO TUMORAL.

Al examinar la posible relación entre la expresión de *SLUG* en sangre periférica y la de E-cadherina en el tejido tumoral, se alcanzan los siguientes resultados:

Tabla de contingencia E-cadherina\**SLUG*:

			PCR <i>SLUG</i>		Total
			<i>SLUG</i> negativo	<i>SLUG</i> positivo	
E-cadh.	0	Recuento	15	7	22
		% de <i>SLUG</i>	50,0%	53,8%	51,2%
	1	Recuento	15	6	21
		% de <i>SLUG</i>	50,0%	46,2%	48,8%
Total		Recuento	30	13	43
		% de <i>SLUG</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,054(a)	1	,817
N de casos válidos	43		

a.0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,35.

Ante estos resultados no podemos afirmar que haya asociación entre las variables.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Ecadh+ 1-2	-,154	,665	,054	1	,817	,857	,233	3,159
Constante	-,762	,458	2,772	1	,096	,467		

Ante este resultado de OR se podría pensar que E-cadherina positiva disminuye la posibilidad de *SLUG* positivo, pero este resultado tampoco es estadísticamente significativo, por lo que no podemos afirmar que el tener expresión de E-cadherina aumente la probabilidad de tener *SLUG* negativo.

Si realizamos el análisis de regresión logística considerando *SLUG* la variable independiente y E-cadherina la variable dependiente, los resultados son los mismos.

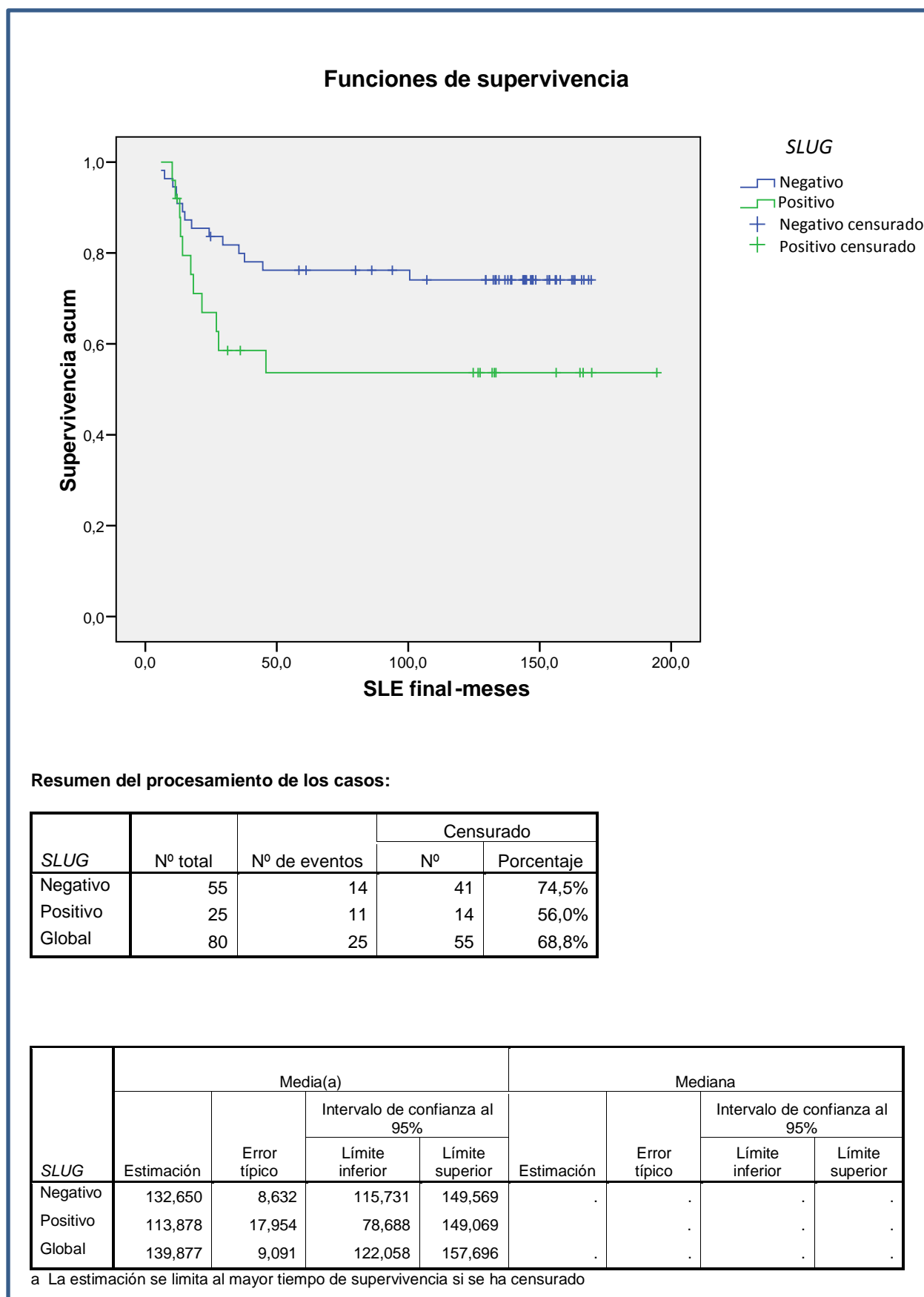
## 8. INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE *SLUG* EN SANGRE PERIFÉRICA Y DE E-CADHERINA EN TEJIDO TUMORAL DE PACIENTES CON CÁNCER DE COLÓN LOCALIZADO SOBRE SU SUPERVIVENCIA (SLE Y SG)

### 8.1. Influencia de la expresión de *SLUG* y E-cadherina sobre la SLE.

#### 8.1.1. Influencia de la expresión de *SLUG* sobre la SLE.

Si analizamos la influencia de la expresión de *SLUG* sobre la SLE, los resultados obtenidos son los siguientes:



Figura 29. Función de supervivencia (SLE) según la variable *SLUG*.

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,431	1	<b>,064</b>
Breslow (Generalized Wilcoxon)	3,288	1	,070
Tarone-Ware	3,386	1	,663

Regresión de Cox:

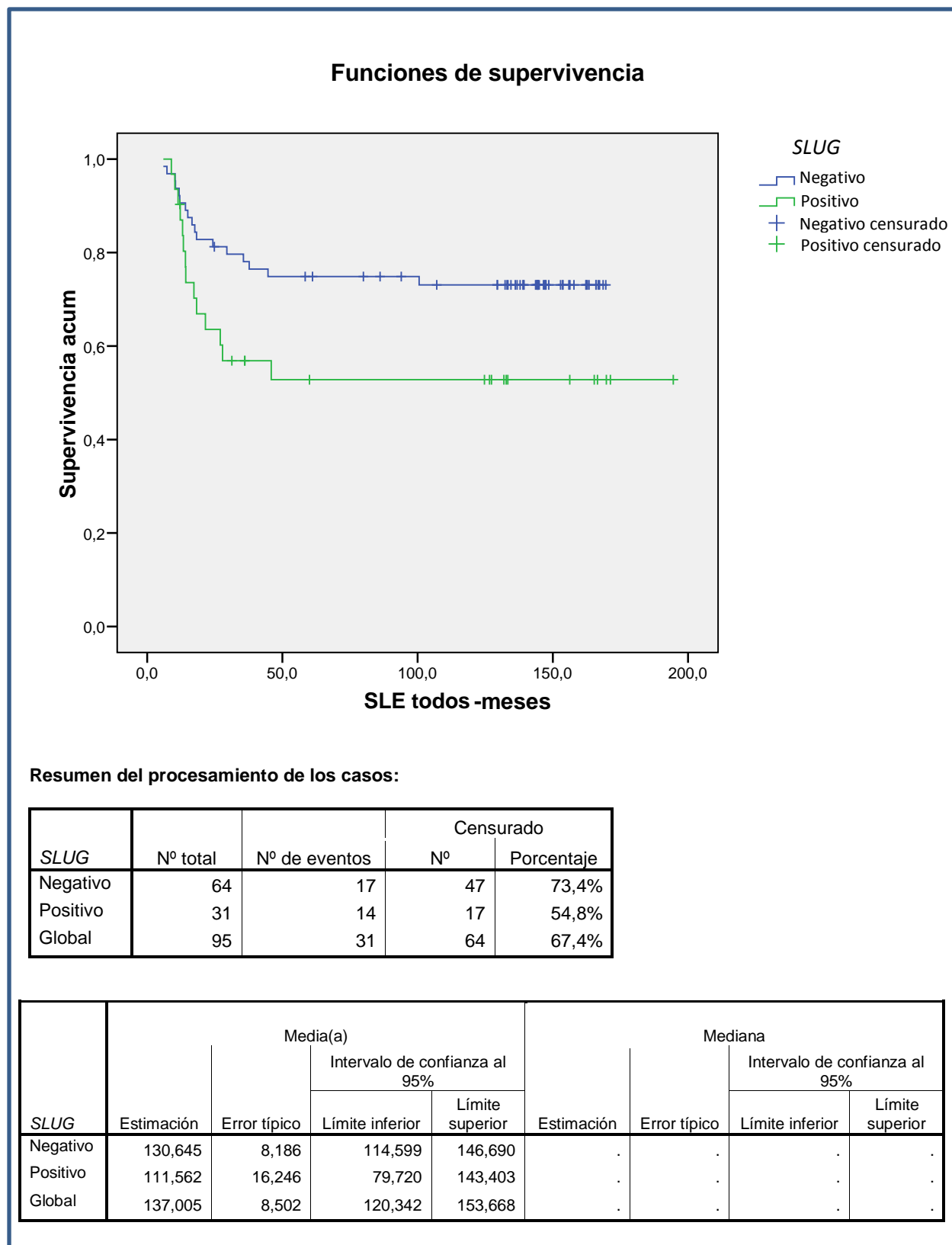
	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG pos</i>	,732	,404	3,280	1	<b>,070</b>	<b>2,080</b>	,942	4,594

Referencia: *SLUG* negativo

La mediana de supervivencia libre de enfermedad no había sido alcanzada en ninguno de los grupos al finalizar el seguimiento del estudio. Un 25,5% de los pacientes con *SLUG* negativo habían recaído, frente a un 44,0% de los pacientes con *SLUG* positivo. **La diferencia es importante, como se puede observar en la separación de las curvas de supervivencia, si bien los resultados no alcanzan la significación estadística, probablemente por falta de potencia.**

Teniendo esto en cuenta, se decidió realizar, de manera exploratoria, el análisis de supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de *SLUG* incluyendo todos los pacientes con estadio localizado que inicialmente entraron en el estudio (95 pacientes) obteniendo los siguientes resultados:

Figura 30. Función de supervivencia (SLE) según la variable *SLUG* en los 95 pacientes con CCR localizado inicialmente incluidos en el estudio.



Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,179	1	<b>,041</b>
Breslow (Generalized Wilcoxon)	4,082	1	,043
Tarone-Ware	4,161	1	,041

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG pos</i>	,724	,362	4,000	1	<b>,045</b>	<b>2,063</b>	1,015	4,196

Referencia: *SLUG* negativo.

En este caso, incluidos los 95 pacientes con estadio localizado, sin excluir aquellos en los que la muestra de sangre periférica se había obtenido durante la adyuvancia o al finalizarla, **los resultados alcanzan la significación estadística. La HR es 2,06, lo que significa que el tener *SLUG* positivo duplica el riesgo de recidiva.**

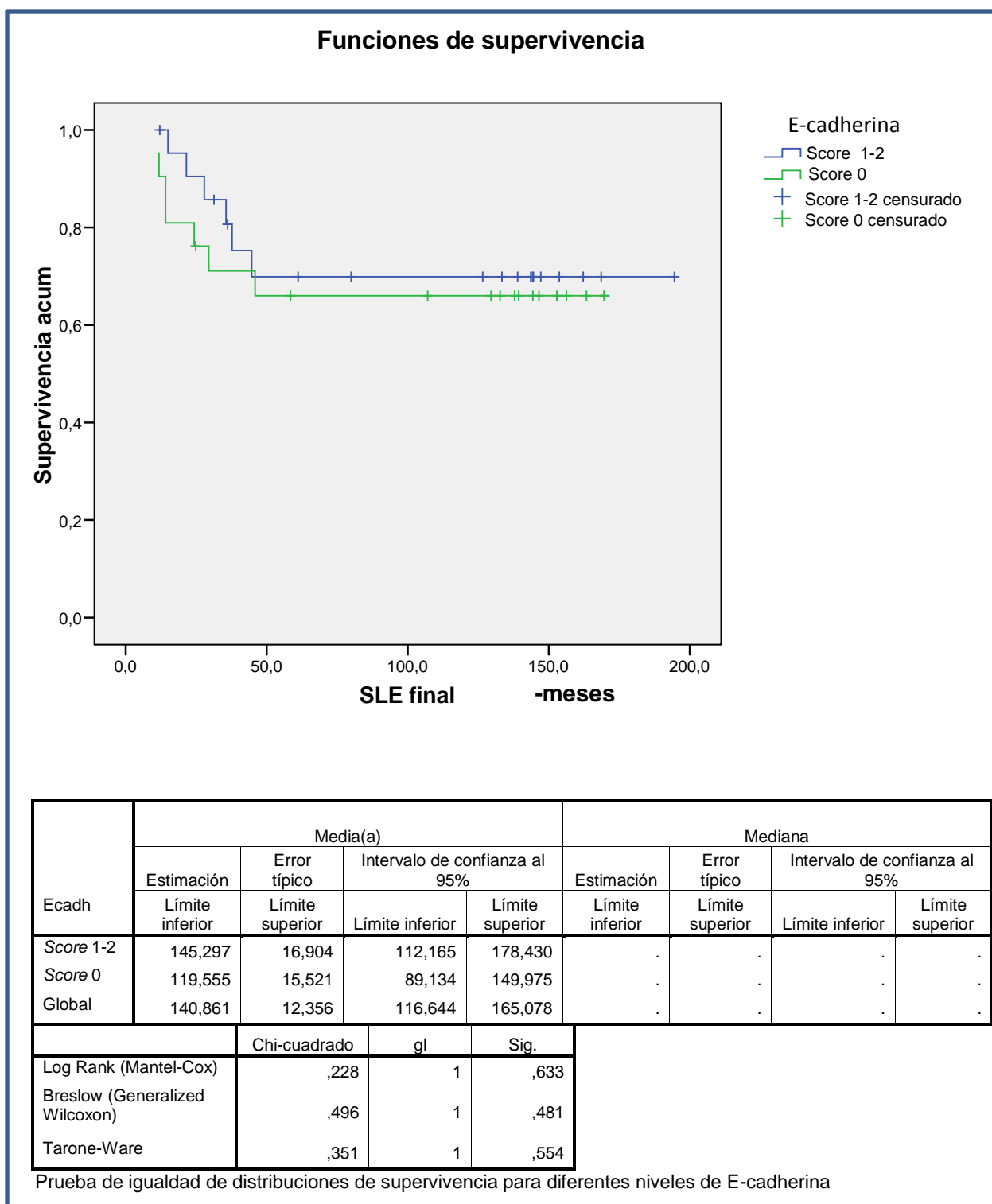
### 8.1.2. Influencia de la expresión de E-cadherina sobre la SLE.

Al estudiar la influencia de la expresión de E-cadherina sobre la SLE, se obtienen los siguientes resultados:

Resumen del procesamiento de los casos:

E-cadh	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
Score 1-2	22	6	16	72,7%
Score 0	21	7	14	66,7%
Global	43	13	30	69,8%

Figura 31. Función de supervivencia (SLE) según la expresión de E-cadherina.



La mediana de SLE no había sido alcanzada en ninguno de los dos grupos.

Los resultados no son estadísticamente significativos.

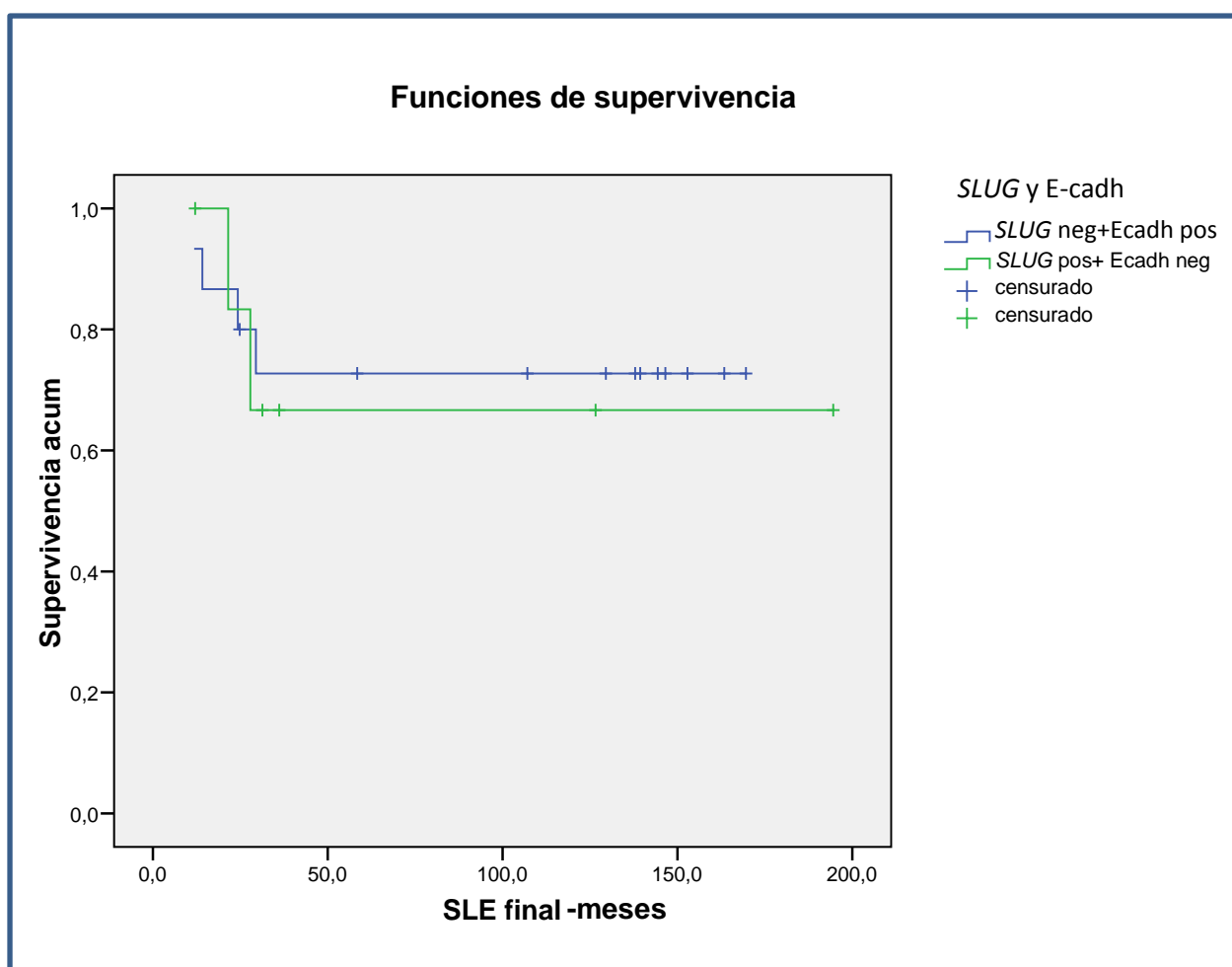
### 8.1.3. Influencia de la expresión de ambos, *SLUG* y E-cadherina sobre la SLE.

Como se puede observar en la siguiente tabla, el número de pacientes con CCR localizado que presentan *SLUG* negativo y E-cadherina positiva duplica al de pacientes con *SLUG* positivo y E-cadherina negativa.

Resumen del procesamiento de los casos:

<i>SLUG</i> +E-cad	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
Neg+Pos	15	4	11	73,3%
Pos+Neg	7	2	5	71,4%
Global	22	6	16	72,7%

Figura 32. Función de supervivencia (SLE) según la expresión de *SLUG* y E-cadherina



	Media(a)				Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
<i>SLUG</i> +Ecad								
Neg+Pos	128,813	17,440	94,632	162,995	.	.	.	.
Pos+Neg	137,920	32,692	73,843	201,997	.	.	.	.
Global	144,409	17,304	110,494	178,325	.	.	.	.

a La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Continuación de la figura 32.

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*+Ecadherina:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,035	1	,852
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,009	1	,923
Tarone-Ware	,020	1	,886

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG</i> pos +Ecadh neg	,162	,867	,035	1	,852	1,175	,215	6,428

Referencia: *SLUG* negativo + E-cadherina positiva.

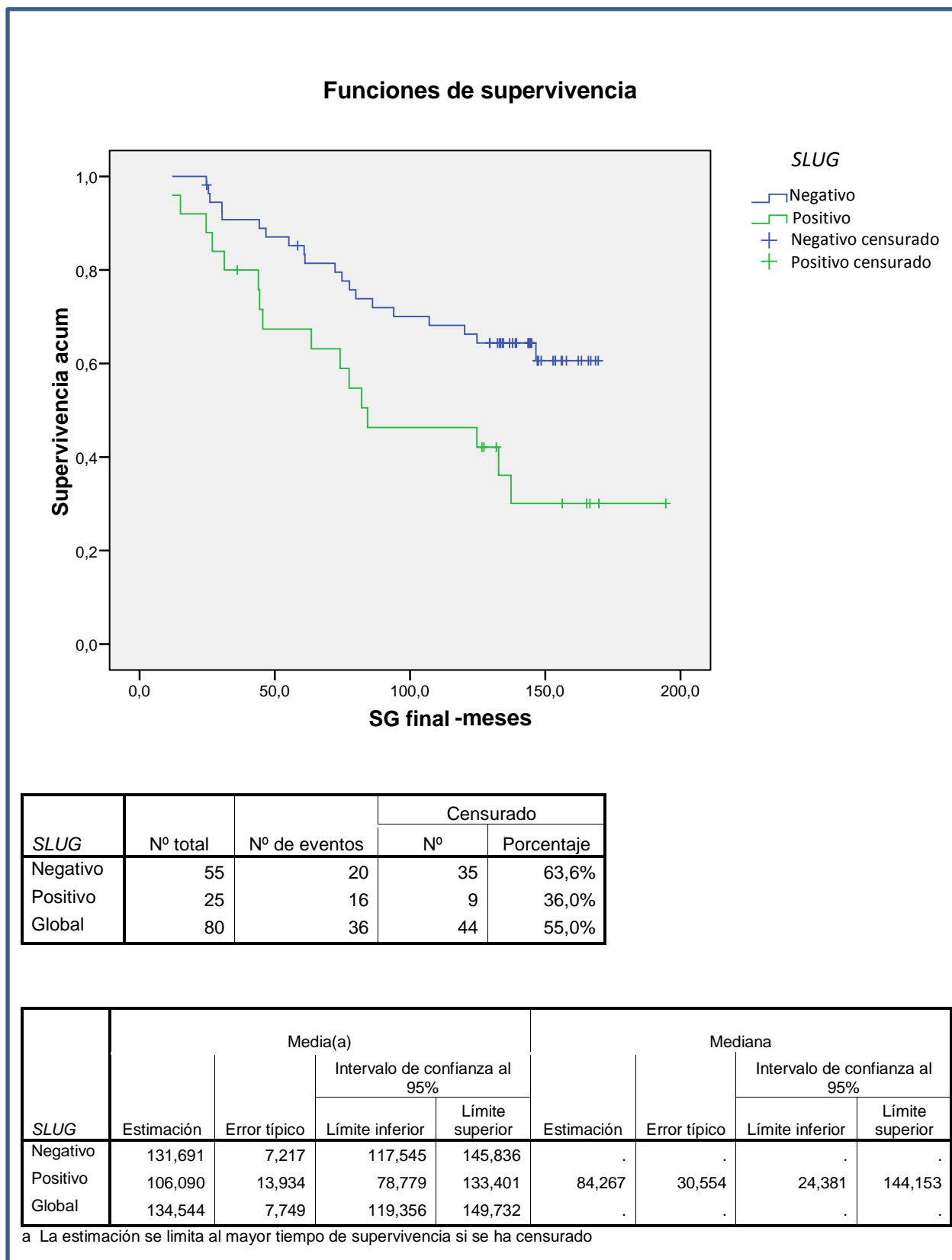
La mediana de SLE no había sido alcanzada en ninguno de los dos grupos al finalizar el seguimiento del estudio y el escaso número de eventos puede haber dificultado el encontrar diferencias entre ellos.

## 8.2. Influencia de la expresión de *SLUG* y E-cadherina sobre la SG en pacientes con CCR localizado.

### 8.2.1. Influencia de la expresión de *SLUG* sobre la SG en pacientes con CCR localizado.

Al analizar la influencia de la expresión de *SLUG* sobre la SG en pacientes con CCR localizado, se obtienen los siguientes resultados:

Figura 33. Función de supervivencia (SG) en pacientes con estadio I-III según la variable SLUG.





Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,473	1	<b>,011</b>
Breslow (Generalized Wilcoxon)	6,172	1	,013
Tarone-Ware	6,365	1	,012

Regresión de Cox:

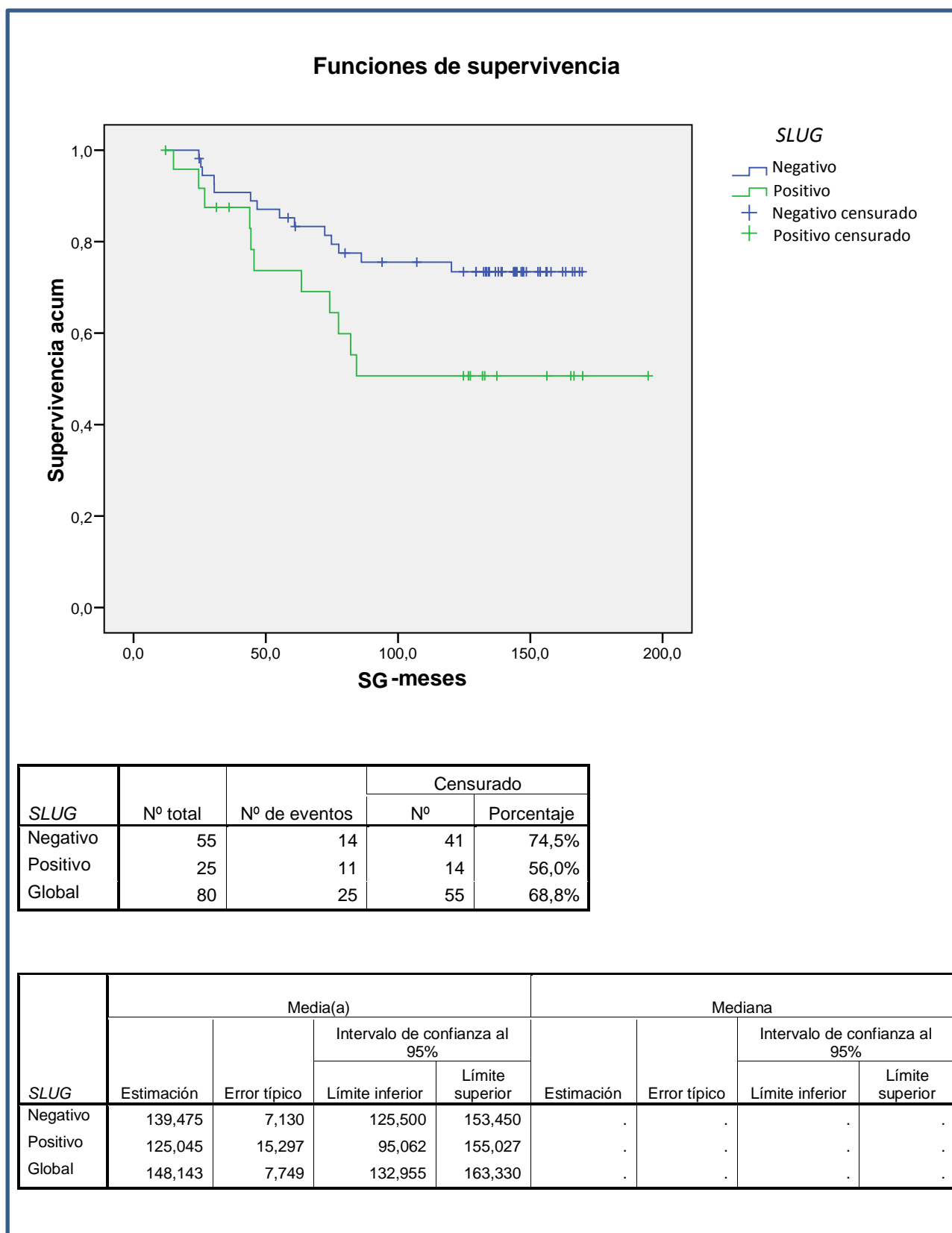
	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG pos</i>	,832	,337	6,118	1	<b>,013</b>	<b>2,299</b>	1,189	4,446

Referencia: *SLUG* negativo.

En el grupo de pacientes con estadio I-III y *SLUG* negativo no se había alcanzado la mediana de SG cuando finalizó el seguimiento del estudio, mientras que para los pacientes *SLUG* positivo fue de 84,27 meses. Estos resultados son **estadísticamente significativos**. El valor de HR (2,29) indica que **los pacientes con *SLUG* positivo tienen más del doble de probabilidad de muerte** que los que tienen *SLUG* negativo.

El anterior análisis de supervivencia global se realizó teniendo en cuenta todos los éxitos de los pacientes, independientemente de la causa de los mismos. Teniendo en cuenta que 11 de estos pacientes con CCR localizado habían fallecido por otras causas, sin recidiva del tumor colorrectal (lo que supone un 30,6% de las muertes en este grupo) se decidió analizar la supervivencia global considerando la **mortalidad causa-específica** (por CCR) y los resultados son los siguientes:

Figura 34. Función de supervivencia (SG) considerando la mortalidad causa-específica por CCR en pacientes con estadio I-III según la variable SLUG.



Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,801	1	<b>,051</b>
Breslow (Generalized Wilcoxon)	3,602	1	,058
Tarone-Ware	3,718	1	,054

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG pos</i>	,768	,404	3,621	1	<b>,057</b>	<b>2,156</b>	,977	4,755

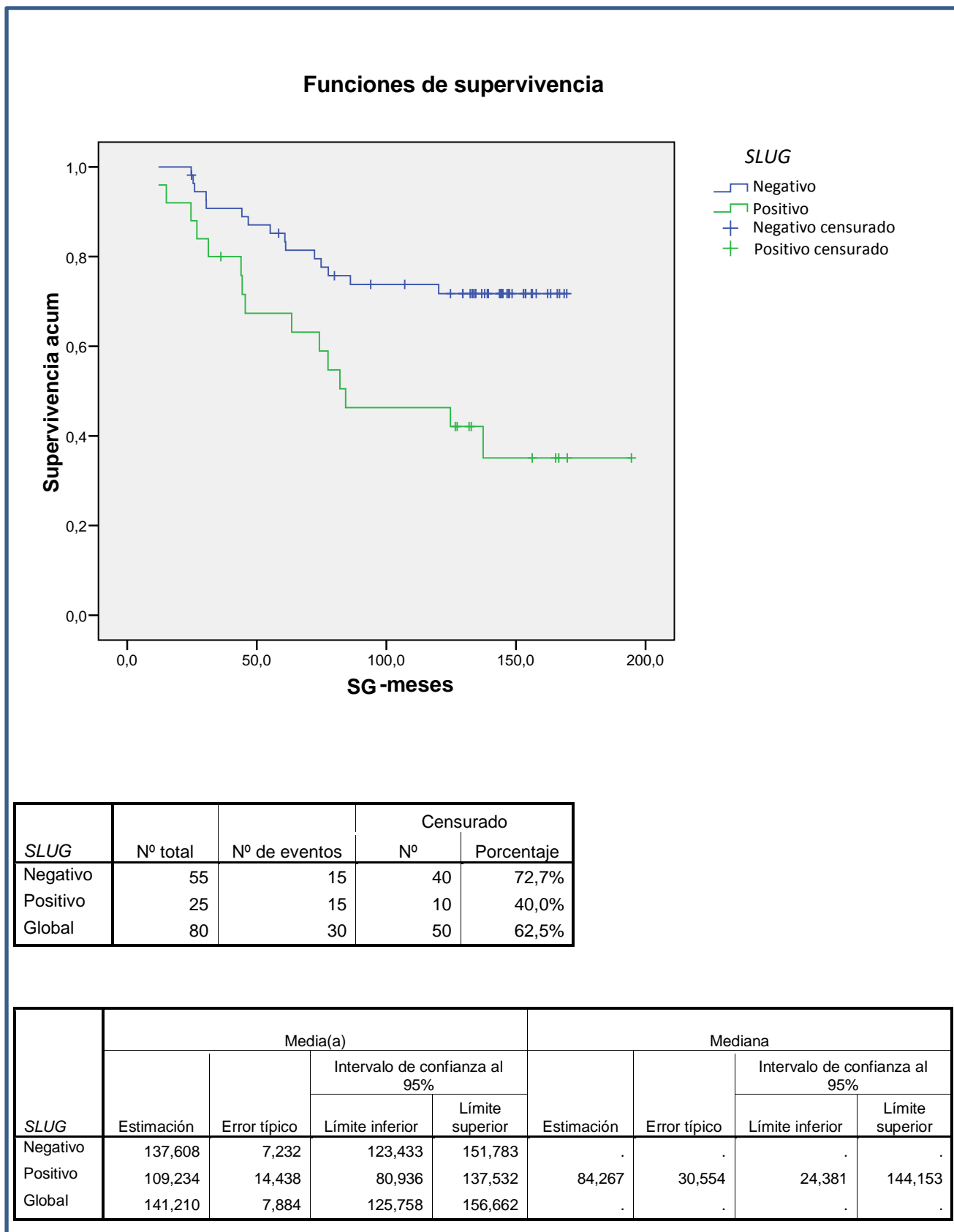
Referencia: *SLUG* negativo

En este caso, al contar con 11 pacientes menos, se pierde la significación estadística (resultados al límite de la significación estadística). En ninguno de los dos grupos se ha alcanzado la mediana de supervivencia global.

De los 11 pacientes que no fallecieron por CCR, sin embargo 5 de ellos murieron por otro tipo de tumor (2 cáncer de próstata, 1 cáncer de pulmón, 1 cáncer gástrico y 1 tumor de intestino delgado) por lo que realmente sólo 6 pacientes habían fallecido por causa no oncológica.

Analizando la SG considerando censurados esos 6 pacientes que fallecieron por otras causas, sin tener tumor activo, los resultados son los siguientes:

Figura 35. Función de supervivencia (SG) considerando la mortalidad causa-específica por cáncer en pacientes con estadio I-III según la variable SLUG.



Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8,399	1	,004
Breslow (Generalized Wilcoxon)	7,328	1	,007
Tarone-Ware	7,827	1	,005

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG</i> pos	1,017	,366	7,719	1	,005	2,766	1,349	5,668

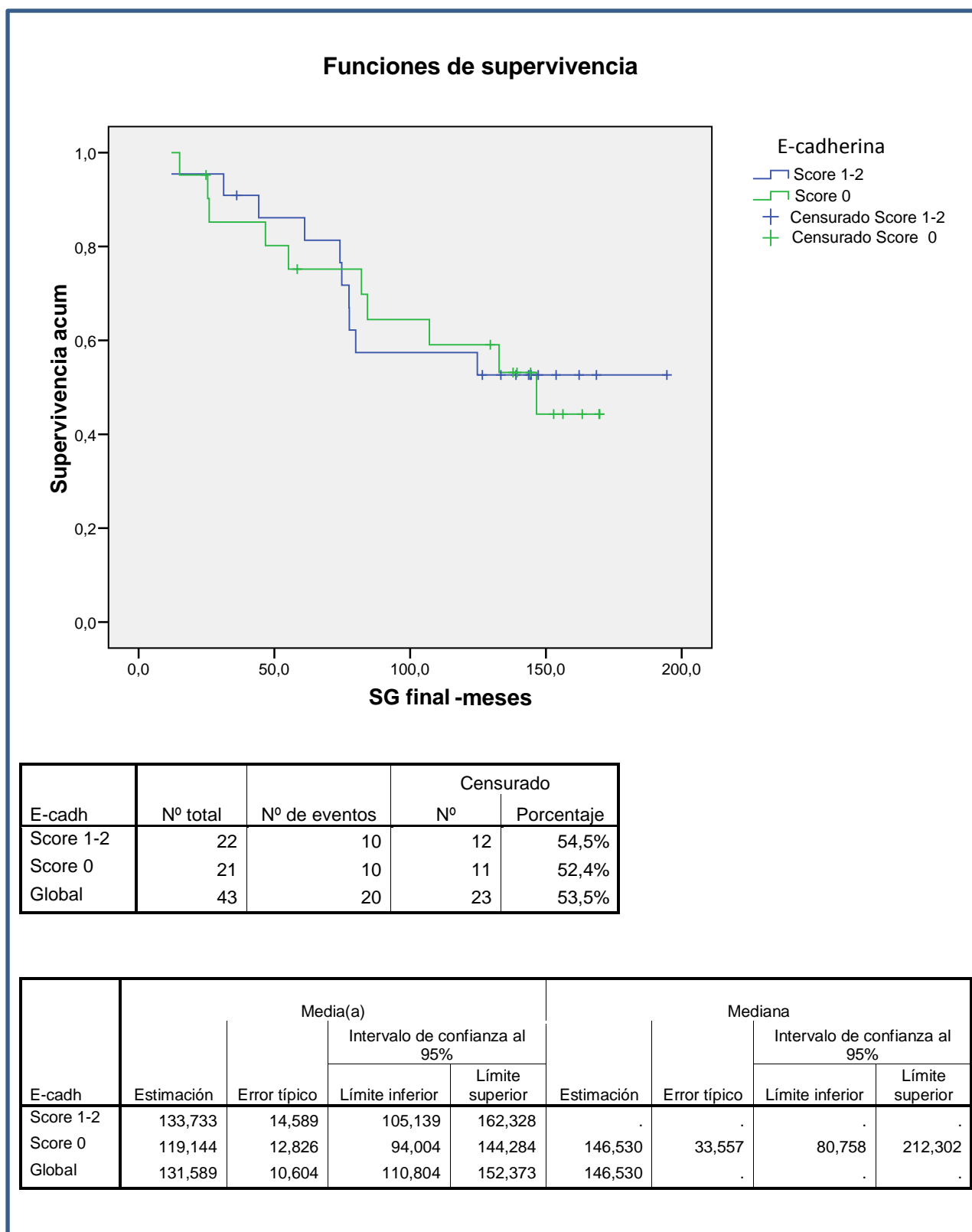
Referencia: *SLUG* negativo

En este análisis los resultados **sí son estadísticamente significativos**. La mediana de SG no se había alcanzado para los pacientes con *SLUG* negativo y fue de 84,27 meses para los pacientes con *SLUG* positivo. **La detección de *SLUG* positivo aumenta el riesgo de muerte 2,77 veces respecto a tener *SLUG* negativo en los pacientes con CCR localizado de nuestro estudio.**

### 8.2.2. Influencia de la expresión de E-cadherina sobre la SG en pacientes con CCR localizado.

Estos son los resultados al estudiar, en pacientes con CCR localizado, la influencia de la expresión de E-cadherina sobre la SG:

Figura 36. Función de supervivencia (SG) en pacientes con estadio I-III según la variable E-cadherina.



Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de E-cadherina:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,014	1	,907
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,000	1	1,000
Tarone-Ware	,001	1	,972

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
E-cadh score 0	-,052	,448	,014	1	,907	,949	,395	2,284

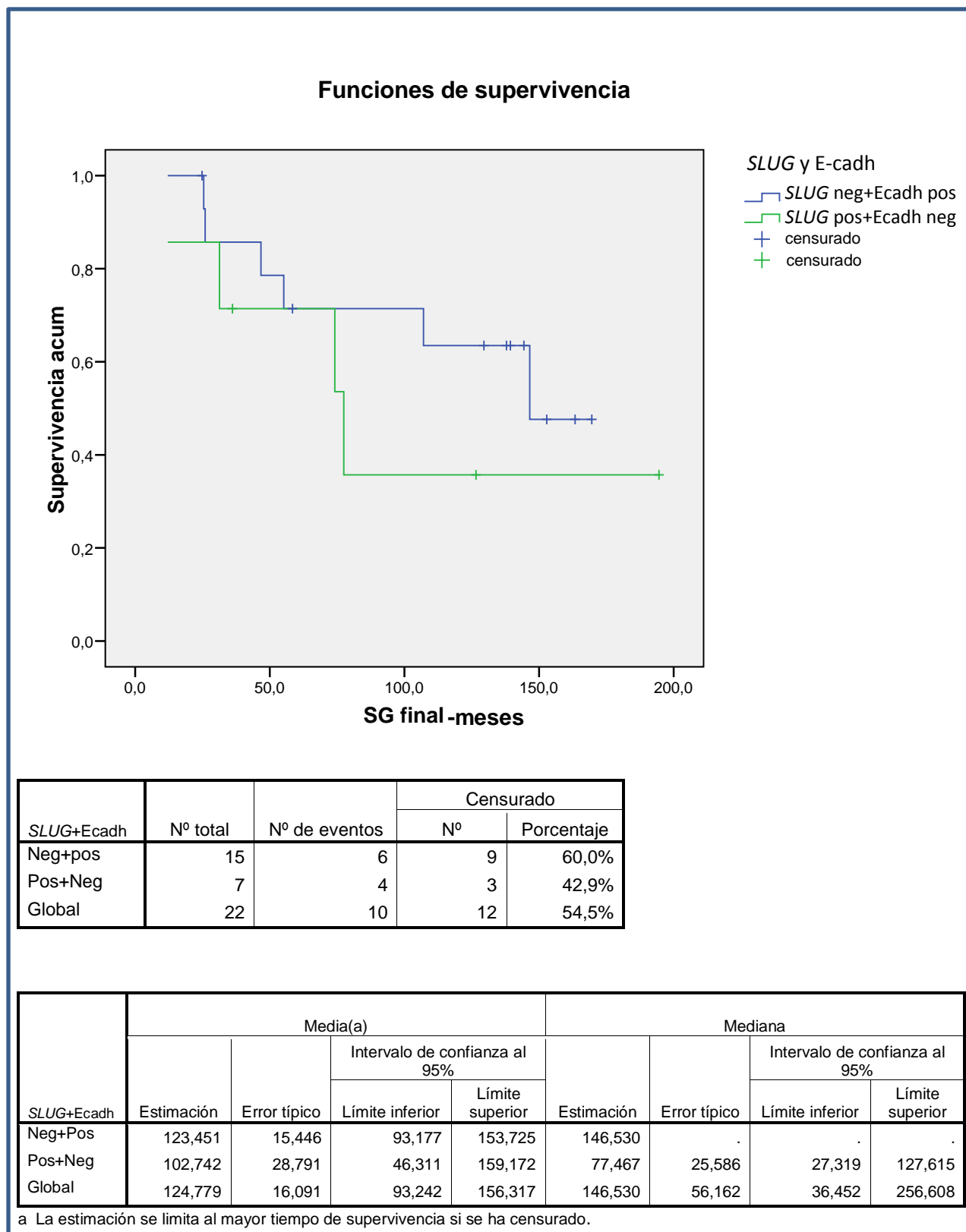
Referencia: E-cadherina score 1-2.

La mediana no se ha alcanzado en el grupo de score 1-2, pero en este caso los resultados no son estadísticamente significativos y no objetivamos diferencias en la supervivencia de los pacientes en función de la determinación de E-cadherina.

### 8.2.3. Influencia de la expresión de ambos, *SLUG* y E-cadherina, sobre la SG en pacientes con CCR localizado.

Al estudiar la influencia de la expresión de ambas variables, de forma conjunta, sobre la SG en pacientes con CCR localizado, obtenemos los siguientes resultados:

Figura 37. Función de supervivencia (SG) en pacientes con estadio I-III según las variables *SLUG* y E-cadherina.





Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*+Ecadherina:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,832	1	,362
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,938	1	,333
Tarone-Ware	,929	1	,335

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
SLUG pos + E-cadh neg	,585	,651	,810	1	,368	1,796	,502	6,427

Referencia: *SLUG* negativo + E-cadherina positiva.

La mediana de SG para los pacientes con estadio localizado que tenían *SLUG* negativo y E-cadherina positiva fue de 146,53 meses, mientras que para los para los pacientes con *SLUG* positivo y E-cadherina negativa fue de 77,47 meses. Sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

## 9. CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *SLUG* CON OTRAS VARIABLES PRONÓSTICAS EN CCR AVANZADO.

### 9.1. Correlación de la expresión de *SLUG* con el número de localizaciones metastásicas.

Para analizar la posible relación entre la expresión de *SLUG* en sangre periférica y el número de localizaciones metastásicas, agrupamos a los pacientes que presentaban 2 o más localizaciones, para analizar sus resultados frente a los que presentaban una única localización metastásica. Los resultados son los siguientes:

Tabla de contingencia Número de localizaciones metastásicas\* *SLUG*:

			<i>SLUG</i>		Total
			Neg	Pos	0
Nº LocalizacionesMts	1	Recuento	20	26	46
		% de <i>SLUG</i>	83,3%	59,1%	67,6%
	≥2	Recuento	4	18	22
		% de <i>SLUG</i>	16,7%	40,9%	32,4%
Total		Recuento	24	44	68
		% de <i>SLUG</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,170(a)	1	,041
N de casos válidos	68		

(a)0 casillas tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 7,76.

**El resultado es estadísticamente significativo, es decir, podemos afirmar que existe una relación entre el número de localizaciones metastásicas y la expresión de *SLUG* en sangre periférica.**

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
NºLocalizacionesMts ≥2	1,242	,628	3,913	1	,048	<b>3,462</b>	1,011	11,846
Constante	,262	,297	,778	1	,378	1,300		

Referencia: NºLocalizacionesMts 1.

**Tener 2 o más localizaciones metastásicas aumenta la probabilidad de *SLUG* positivo (OR 3,46) respecto a tener metástasis en una sola localización, y estos resultados son estadísticamente significativos (p. 048)**

## 9.2. Correlación de la expresión de *SLUG* con la localización de las metástasis (hepática vs otras)

Las metástasis hepáticas son un factor de mal pronóstico en estos pacientes, por lo que decidimos estudiar la posible relación entre la expresión de *SLUG* en sangre periférica y la localización hepática de las lesiones metastásicas. Estos son los resultados obtenidos:

Tabla de contingencia Metástasis hepáticas\* *SLUG*:

			SLUG		Total
			Neg	Pos	
Mts Hep	NO	Recuento	15	12	27
		% de SLUG	62,5%	27,3%	39,7%
	SI	Recuento	9	32	41
		% de SLUG	37,5%	72,7%	60,3%
Total		Recuento	24	44	68
		% de SLUG	100,0%	100,0%	100,0%

De los pacientes con CCR avanzado y *SLUG* positivo un 72,7% tenían metástasis hepáticas, mientras que entre los *SLUG* negativos el porcentaje de afectación hepática era del 37,5%.

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,050 (a)	1	,005
N de casos válidos	68		

(a) 0 casillas tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,53.

**El resultado es estadísticamente significativo, es decir, podemos afirmar que existe una relación entre la presencia de metástasis hepáticas y la expresión de *SLUG* en sangre periférica.**

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
MtsHep.SI	1,492	,541	7,611	1	,006	<b>4,444</b>	1,540	12,825
Constante	-,223	,387	,332	1	,565	,800		

Referencia: MtsHep.NO.

**La localización hepática de las metástasis aumenta la probabilidad de *SLUG* positivo (OR 4,44) respecto a otras localizaciones metastásicas y estos datos son estadísticamente significativos (p .006)**

### 9.3. Correlación de la expresión de *SLUG* con el número de líneas de tratamiento.

Para estudiar la posible correlación entre la expresión de *SLUG* en sangre periférica y el número de líneas de tratamiento, se agrupó a los pacientes que se encontraban en 1ª línea de tratamiento por una parte y a los que habían recibido 2 o más líneas de tratamiento por otra. A continuación se detallan los resultados de este análisis:

Tabla de contingencia Línea de tratamiento\**SLUG*:

			<i>SLUG</i>		Total
			Neg	Pos	
Línea Tto.	1	Recuento	21	20	41
		% de <i>SLUG</i>	87,5%	45,5%	60,3%
	≥2	Recuento	3	24	27
		% de <i>SLUG</i>	12,5%	54,5%	39,7%
Total	Recuento		24	44	68
	% de <i>SLUG</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Entre los pacientes con CCR avanzado y *SLUG* negativo la gran mayoría se encontraban en 1ª línea de tratamiento (87,5%) mientras que entre los pacientes con *SLUG* positivo más de la mitad (54,5%) se encontraban en posteriores líneas de tratamiento.

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,467 (a)	1	<b>,001</b>
N de casos válidos	68		

(a) 0 casillas tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 9,53.

**El resultado es estadísticamente significativo, es decir, podemos afirmar que existe una relación entre el número de líneas de tratamiento y la expresión de *SLUG* en sangre periférica.**

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Línea Tto. ≥2	2,128	,687	9,584	1	<b>,002</b>	<b>8,400</b>	2,183	32,319
Constante	-,049	,312	,024	1	,876	,952		

Referencia: Línea Tto.1.

**El mayor número de líneas de tratamiento (≥2 vs 1) aumenta la probabilidad de *SLUG* positivo (OR 8,40) y los resultados son estadísticamente significativos (p .002)**

Si agrupamos a los pacientes en 1ª y 2ª línea de tratamiento por un lado y a los que estaban en 3ª línea o posteriores, los resultados obtenidos también son estadísticamente significativos:

Tabla de contingencia Línea de tratamiento\**SLUG*:

			<i>SLUG</i>		Total
			Neg	Pos	
Línea Tto. ≤2	Recuento		22	26	48
		% de <i>SLUG</i>	91,7%	60,5%	71,6%
	≥3	Recuento	2	17	19
		% de <i>SLUG</i>	8,3%	39,5%	28,4%
Total	Recuento		24	43	67
	% de <i>SLUG</i>		100,0%	100,0%	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado:

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	7,381 (a)	1	<b>,007</b>
N de casos válidos	68		

(a) 0 casillas tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,81.

Regresión logística:

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95,0% para OR	
							Inferior	Superior
Línea Tto. ≥3	1,973	,802	6,057	1	<b>,014</b>	<b>7,192</b>	1,494	34,617
Constante	,167	,290	,333	1	,564	1,182		

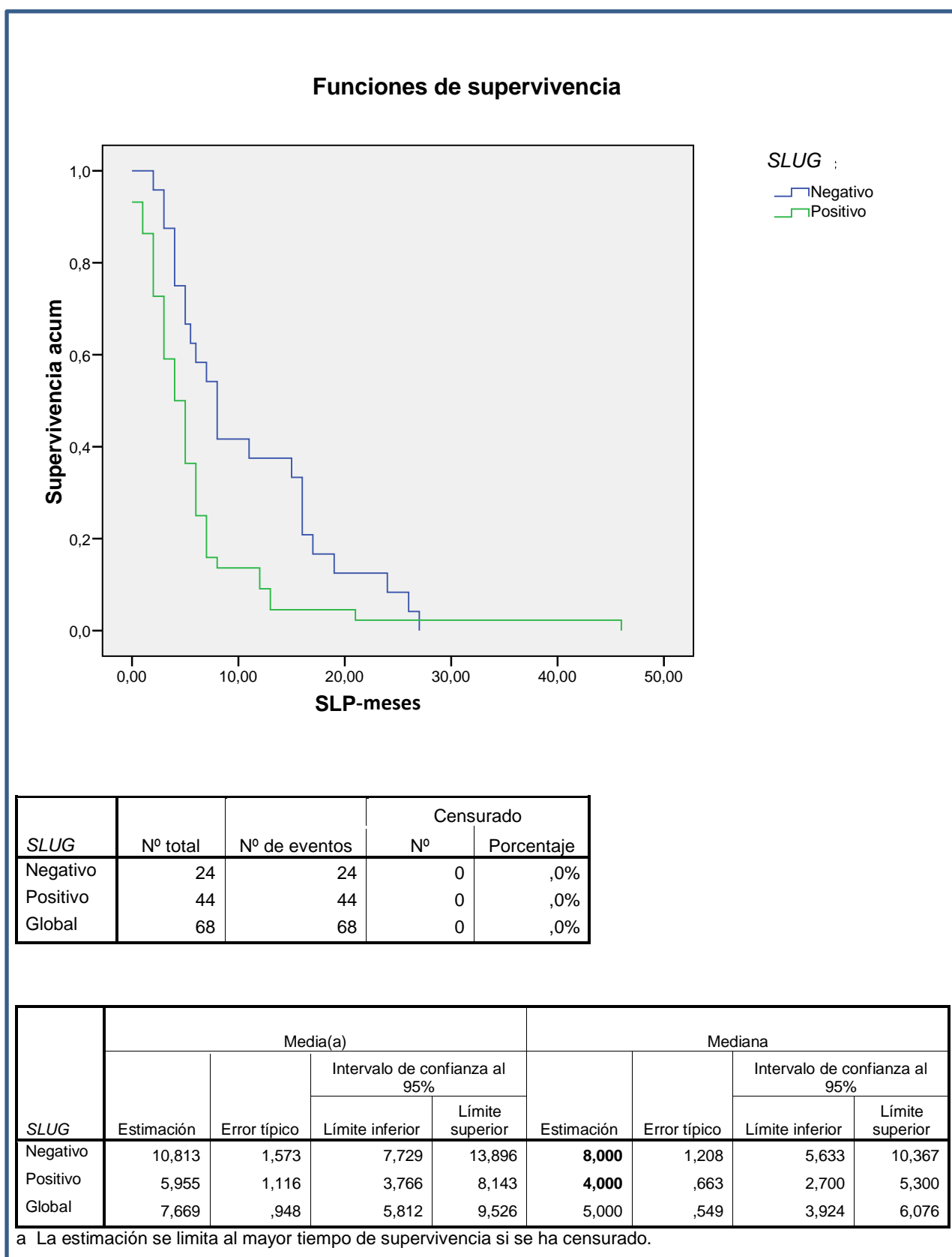
Referencia: Línea Tto. ≤2.

En este caso la OR es algo inferior que en el análisis anterior, pero **se mantiene la significación estadística.**

## 10. INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE SLUG EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON CCR METASTÁSICO SOBRE SU SUPERVIVENCIA (SLP Y SG)

### 10.1. Influencia de la expresión de *SLUG* sobre la SLP.

Al analizar la influencia de la expresión de SLUG en sangre periférica de pacientes con CCR metastásico sobre su SLP, los resultados obtenidos son los siguientes:

Figura 38. Función de supervivencia (SLP) según la expresión de *SLUG*.

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	7,321	1	<b>,007</b>
Breslow (Generalized Wilcoxon)	9,510	1	,002
Tarone-Ware	9,514	1	,002

La mediana de SLP estimada para los pacientes con *SLUG* negativo fue de 8,0 meses, frente a 4,0 meses para los pacientes con *SLUG* positivo. Estos resultados son **estadísticamente significativos**.

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG</i> pos	,662	,264	6,285	1	<b>,012</b>	<b>1,938</b>	1,155	3,252

Referencia: *SLUG* negativo.

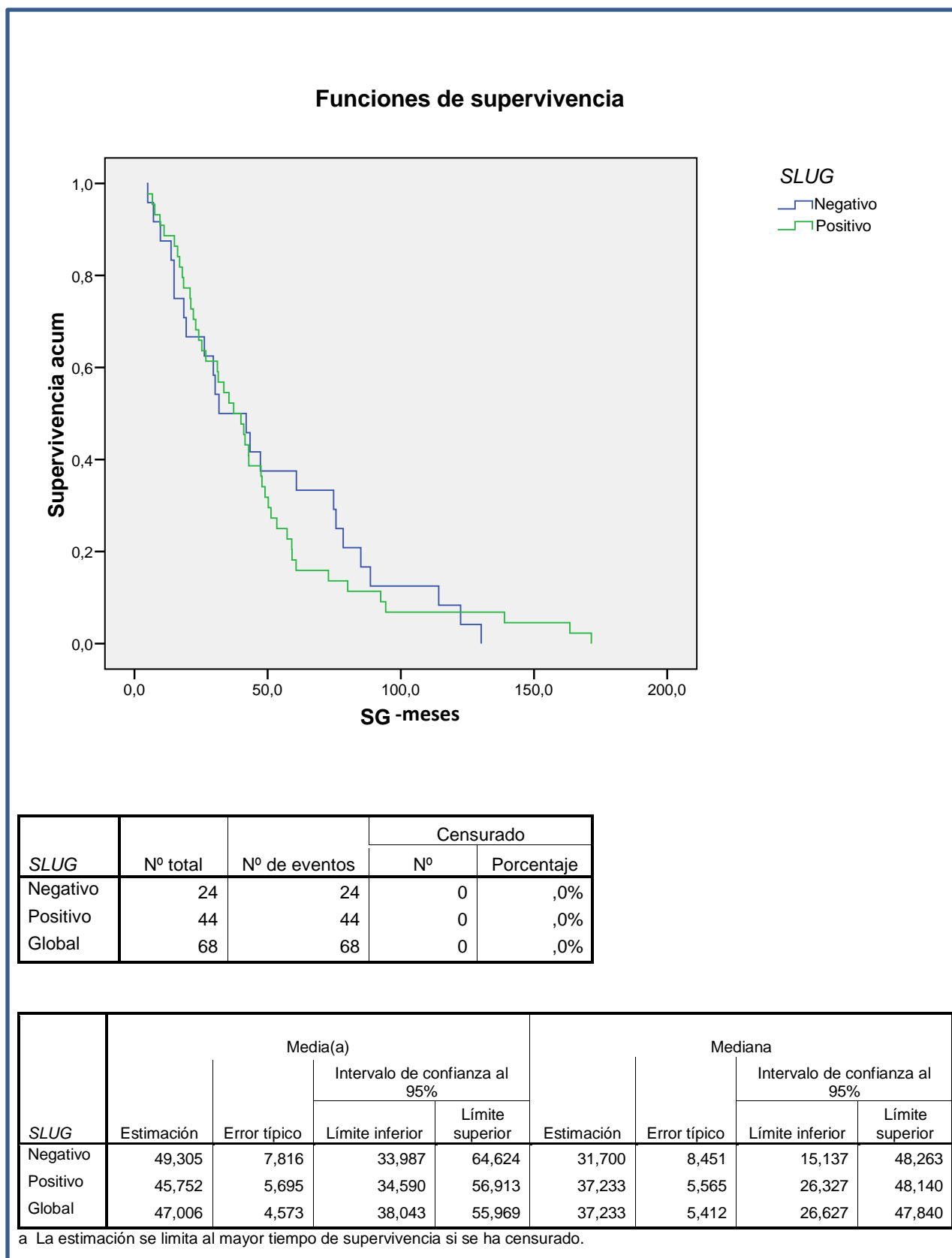
El valor de HR=1,94 indica que **el resultado de *SLUG* positivo aumenta la probabilidad de progresión casi el doble** respecto a tener *SLUG* negativo, y este resultado es **estadísticamente significativo**.

## 10.2. Influencia de la expresión de *SLUG* sobre la SG de los pacientes con CCR metastásico.

Al estudiar la influencia de la expresión de *SLUG* en sangre periférica de pacientes con CCR metastásico sobre su SG, obtenemos los siguientes resultados:



Figura 39. Función de supervivencia (SG) de los pacientes con CCR metastásico según la expresión de *SLUG*.



Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *SLUG*:

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,053	1	,817
Breslow (Generalized Wilcoxon)	,032	1	,857
Tarone-Ware	,099	1	,754

En ambos grupos se habían producido el 100% de los eventos. En este caso no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

Regresión de Cox:

	B	ET	Wald	gl	Sig.	HR	95,0% IC para HR	
							Inferior	Superior
<i>SLUG</i> pos	,060	,260	,053	1	,817	1,062	,638	1,766

Referencia: *SLUG* negativo.

El valor de HR es 1,06 y los resultados no son estadísticamente significativos.

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal es el tercer tumor en incidencia a nivel mundial y el de mayor incidencia en España, teniendo en cuenta ambos sexos. Además, en los últimos años su incidencia está en aumento, posiblemente en relación con factores ambientales y el envejecimiento de la población. En las últimas décadas, se han realizado grandes avances en esta patología, tanto en la comprensión de sus bases moleculares como en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. A pesar de ello, supone la segunda causa de muerte por cáncer en nuestro país<sup>1,2</sup>. Por todo esto, el CCR supone un problema de gran magnitud en nuestro medio.

Las **características generales** de nuestra muestra son similares a las de la población con CCR a nivel mundial<sup>1,2</sup>, con una mediana de edad de 67 años en el grupo con enfermedad localizada y de 63 años en el de enfermedad avanzada. En ambos grupos hay un predominio del género masculino, que supone el 58,8% de los pacientes con CCR localizado y un 67,6% de los enfermos con CCR metastásico. Según los datos epidemiológicos disponibles en nuestro país, aproximadamente un 60% de los casos nuevos de CCR al año son hombres<sup>2</sup>. En cuanto a la histología, todos los tumores analizados en nuestra serie son adenocarcinomas, el tipo histológico más común<sup>39</sup>. El lugar de asiento más frecuente de las metástasis en los pacientes con enfermedad avanzada de nuestro estudio es el hígado (60,3%), dato que también concuerda con lo reflejado en la literatura<sup>6,7</sup>.

En todos los pacientes incluidos en nuestro estudio procedimos a realizar la **determinación de *SLUG*** en sangre periférica. De los 80 pacientes con CCR localizado, el resultado fue negativo en 55 (68,8%) y positivo en 25 (31,3%). Destacamos, por tanto, el mayor porcentaje de pacientes con *SLUG* negativo, lo esperable en enfermedad localizada.

De los 68 pacientes con CCR metastásico, la determinación de *SLUG* fue positiva en 44 (64,7%) y negativa en el resto (24 pacientes; 35,3%).

Observamos, por tanto, que es mayor el porcentaje de pacientes con *SLUG* positivo, al contrario de lo que ocurría en los pacientes con CCR localizado.

En el caso del análisis de la **expresión de E-cadherina** en tejido tumoral, fue posible realizarlo en 43 pacientes con CCR localizado, resultando “positiva” (score 1/débil o 2/moderada o fuerte) en 22 (51,2%) y “negativa” (score 0/nula o muy débil) en 21 pacientes (48,8%). Aunque es mayor la proporción de pacientes con E-cadherina positiva, también lo esperado en enfermedad localizada, la diferencia entre los porcentajes es mucho menor que en el caso de la determinación de *SLUG*.

Varios estudios han descrito una expresión alterada de E-cadherina en la mayoría de los casos de CCR<sup>105,106</sup>. En nuestro análisis esto se corroboraría, ya que un importante porcentaje de las muestras tumorales presentaban una expresión baja de E-cadherina en la membrana celular. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en nuestro trabajo algunas de las muestras sobre las que se realizó el estudio inmunohistoquímico eran antiguas y eso puede haber contribuido a que la validez de la expresión de E-cadherina sea menor.

En el análisis estadístico comparativo, en primer lugar estudiamos la **relación de la expresión de *SLUG* con la extensión tumoral**, analizando los resultados de *SLUG* en el grupo de CCR localizado frente a los del grupo con CCR metastásico, confirmando que existe asociación estadísticamente significativa entre la expresión de *SLUG* y la enfermedad metastásica (OR 4,03; p,000). Estos datos son concordantes con los obtenidos en otros trabajos, como el de Shiori et al (2006)<sup>182</sup>, en el que la expresión de *SLUG* en CCR se asoció al estadio tumoral y al desarrollo de metástasis de manera significativa (p,0007). Si bien estos autores estudiaron la expresión de *SLUG* mediante inmunohistoquímica. Posteriormente, otros autores, como Toiyama et al (2013)<sup>183</sup>, han estudiado la expresión de *SLUG* y Vimentina en CCR, resultando significativamente mayor en la enfermedad avanzada (p,025). En su trabajo realizaron el estudio de *SLUG* mediante RT-PCR cuantitativa en una cohorte y mediante inmunohistoquímica en otra cohorte.

En el grupo de pacientes con **CCR localizado**, analizamos la posible **relación de la expresión de *SLUG* con otras variables clínico-patológicas**

**con valor pronóstico**, como el valor de CEA y el grado histológico. En ninguno de estos casos encontramos asociación entre dichas variables y el resultado de *SLUG*.

No disponemos de datos en la literatura que relacionen la expresión de *SLUG* y el CEA. Hemos de señalar en cuanto a este marcador tumoral sérico que su valor preoperatorio clásicamente se ha considerado dentro de los factores pronósticos clínicos<sup>55-58</sup> y se recomienda recogerlo, aunque actualmente no se utilice para decisión terapéutica. Sin embargo, como ya se ha comentado previamente, los resultados de los estudios son controvertidos, ya que hay autores que no corroboran el valor pronóstico del CEA preoperatorio en los estadios localizados con resección completa y normalización posterior del marcador<sup>46</sup>. En el momento en el que se realizó nuestra recogida de datos sí se consideraba uno de los factores pronósticos en CCR y por esta razón lo incluimos en el análisis.

En cuanto al grado histológico, factor de valor pronóstico reconocido, otros autores también han explorado su posible relación con la expresión de *SLUG*, sin resultados significativos, como por ejemplo Shiori et al (p,7484)<sup>182</sup> y Toiyama et al (p,33)<sup>183</sup>.

Debemos señalar también que al analizar si existe asociación entre la determinación de *SLUG* y los distintos estadios localizados (I, II y III por separado) no obtuvimos resultados estadísticamente significativos, al contrario de lo que ocurre al estudiar los estadios I-III frente al metastásico. Ante estos datos, decidimos explorar si existía relación de la expresión de *SLUG* con la afectación ganglionar, analizando los estadios I-II (ganglios negativos) frente al estadio III (ganglios positivos) pero en este caso tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas. Otros autores sí han hallado asociación entre *SLUG* y el estado ganglionar, como Toiyama et al (p,003)<sup>183</sup>.

De igual manera, investigamos la posible **relación de la expresión de E-cadherina en tejido tumoral de pacientes con CCR localizado con esas mismas variables pronósticas**. Al estudiar la posible correlación de E-cadherina con el grado histológico, teniendo en cuenta el escaso número de muestras grado 3, decidimos realizar un grupo con los tumores grado 1 y otro

con los tumores grado 2 y 3. En este caso sí se encontró correlación estadísticamente significativa, con una OR de 0,21 (p,039). Es decir, la expresión de E-cadherina disminuiría la probabilidad de que el tumor fuera de grado 2-3.

La posible asociación entre la expresión de E-cadherina y la diferenciación tumoral ya fue estudiada por Karatzas et al (1999)<sup>111</sup>. En su trabajo analizaron la expresión de E-cadherina mediante inmunohistoquímica, como en nuestro caso, objetivando una correlación significativa entre ella y el grado tumoral, con una tendencia hacia menor expresión de esta molécula al incrementarse el grado histológico (p<0,001).

En cuanto a la relación de E-cadherina con otros factores pronósticos, no encontramos asociación con el valor de CEA. No disponemos de datos en la literatura que muestren esta relación. Tampoco observamos diferencias de la expresión de E-cadherina según la afectación ganglionar. Por una parte, en el trabajo de Karatzas et al la asociación entre E-cadherina y el estadio tumoral no fue significativa (p,38)<sup>111</sup>, pero otros autores sí han mostrado relación entre la pérdida de E-cadherina y la afectación ganglionar en CCR, como Karamitopoulou et al (2011) (p<0,001)<sup>114</sup>. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos últimos utilizaron como método microarrays y además, hemos de reconocer como una de las limitaciones de nuestro estudio el pequeño número de pacientes en este análisis. Otros estudios aún más recientes, como el de Jie et al (2013)<sup>115</sup> han seguido planteando el papel pronóstico de la expresión de E-cadherina por inmunohistoquímica, junto con la de otras moléculas, en CCR. En su trabajo, la pérdida de expresión de E-cadherina también se correlacionó con un mayor estadio tumoral (p<0,05). Como ya se ha comentado, otra de las limitaciones de nuestra serie es que la antigüedad de algunas muestras puede haber disminuido la validez de la expresión de E-cadherina.

Los factores de transcripción de la familia *SNAIL* inducen el proceso de transición epitelio-mesénquima principalmente a través de la represión de la transcripción de E-cadherina durante el proceso de progresión tumoral y la carcinogénesis de distintos tipos de tumores, entre ellos el CCR<sup>110,123,140</sup>.



Teniendo esto en cuenta, otro de los objetivos de nuestro trabajo es estudiar la **relación entre *SLUG* en sangre periférica y E-cadherina en tejido tumoral**, pero ante los resultados obtenidos del análisis estadístico no podemos afirmar que haya asociación entre ambas variables. El resultado de  $OR < 1$  nos podría hacer pensar que el tener una mayor expresión de E-cadherina disminuiría la probabilidad de obtener un resultado de *SLUG* positivo, frente a tener una expresión baja o nula de E-cadherina, pero los resultados no son estadísticamente significativos. Tampoco han encontrado correlación entre la positividad de *SLUG* y la expresión reducida de E-cadherina otros autores, como Shiori et al (p,3594), quienes postulan que puede deberse a que en el CCR la mayor reducción de E-cadherina se debe a hipermetilación del promotor<sup>182</sup>.

A nuestro juicio, los resultados más interesantes de nuestro estudio han sido los obtenidos al analizar la influencia de la expresión de *SLUG* en sangre periférica sobre la supervivencia de los pacientes con CCR. En el grupo de **enfermedad localizada**, en primer lugar estudiamos la **SLE en función de la expresión de *SLUG***. Al finalizar el seguimiento de nuestro estudio han recaído un 25,5% de los pacientes con *SLUG* negativo, frente a un 44,0% de los enfermos con *SLUG* positivo. Esta diferencia es importante, como también se aprecia en la separación de las curvas de supervivencia correspondientes, si bien nuestros resultados no alcanzan la significación estadística (HR 2,08; p,070), probablemente por falta de potencia. Por ese motivo, decidimos realizar, de manera exploratoria, el análisis de SLE en función de la expresión de *SLUG* incluyendo todos los pacientes con estadio localiado que inicialmente entraron en el estudio (95 pacientes en total, al añadir los 15 pacientes cuya muestra se había obtenido durante la adyuvancia o al finalizarla) y en este caso los resultados sí son estadísticamente significativos (HR 2,06; p,045). Encontramos datos en la misma línea en el trabajo de Toiyama et al, en el que los pacientes con alta expresión de *SLUG* tenían menor SLE que los pacientes con baja expresión de *SLUG* (p,019)<sup>183</sup>.

Teniendo en cuenta que, por una parte, estudios clínicos realizados por nuestro grupo<sup>186-188</sup> sugieren la posibilidad de detectar células tumorales circulantes con características de célula madre cancerígena mediante la

expresión de *SLUG* y, por otra parte, que la detección de CTCs es un marcador pronóstico para diferentes tumores, entre ellos el CCR, hemos analizado nuestros hallazgos en el contexto de los estudios disponibles con CTCs en esta enfermedad.

Varios autores, como Uen y Lu<sup>210,211</sup> han analizado el valor de la persistencia de detección de CTCs tras resección con intención curativa, concluyendo que es un factor de mal pronóstico, asociándose a una menor supervivencia libre de recidiva. En estos estudios se utilizó mRNA de cuatro marcadores moleculares (transcriptasa inversa de la telomerasa humana, citoqueratina-19, citoqueratina-20 y CEA) para detectar CTCs en los pacientes con CCR. Como ya hemos comentado previamente, en nuestro estudio también hemos observado, en los pacientes con CCR localizado que habían sido intervenidos, una tendencia a menor SLE en los que expresaban *SLUG* positivo en sangre periférica.

Por otra parte, la recurrencia en los pacientes con CCR localizado que reciben tratamiento quimioterápico adyuvante se atribuye principalmente a una mala respuesta al régimen de quimioterapia. Así, el detectar CTCs puede ser útil para identificar de forma precoz las metástasis y seleccionar a los pacientes quimio-resistentes que pudieran beneficiarse de otros regímenes terapéuticos. Huang, 2016. Según los análisis de Lu et al<sup>212</sup> la persistencia de CTCs tras quimioterapia adyuvante es un marcador potencial para determinar la evolución clínica en pacientes con CCR. En nuestro estudio, el número de pacientes con disponibilidad de una segunda muestra de sangre periférica tras el tratamiento quimioterápico fue pequeño, por lo que no hemos podido analizar esta cuestión.

También es un objetivo de nuestro estudio analizar la posible **influencia de la expresión de E-cadherina sobre la SLE**, pero en este caso no hemos obtenido resultados significativos, quizá debido a insuficiente potencia estadística por escaso número de pacientes o por insuficiente validez de los resultados inmunohistoquímicos. En el trabajo de Shiori et al, los pacientes con positividad para *SLUG* y expresión baja de E-cadherina son los que mostraban peor pronóstico<sup>182</sup>. Nosotros también planteamos analizar la expresión de ambas variables en nuestros pacientes, intentando corroborar esos datos. Para

poder estudiar la **influencia de ambas variables a la vez, *SLUG* y E-cadherina**, creamos una variable combinando su expresión. En el grupo de CCR localizado el número de pacientes que presentaban *SLUG* negativo y E-cadherina positiva (que hipotéticamente serían los de mejor pronóstico) duplicaba al de enfermos con *SLUG* positivo y E-cadherina negativa, pero al realizar el análisis de SLE no encontramos diferencias entre ambos grupos. La mediana de SLE no había sido alcanzada en ninguno de ellos y el escaso número de eventos puede haber dificultado el encontrar diferencias entre ellos.

Una vez analizada la posible influencia de las variables objeto de nuestro estudio sobre la SLE, investigamos si podrían tenerla sobre la supervivencia global de esos mismos pacientes, con CCR localizado.

Al estudiar la **influencia de la expresión de *SLUG* sobre la SG de los pacientes con enfermedad localizada** objetivamos que se asocia a peores resultados: La mediana de SG es de 84,26 meses para los pacientes con *SLUG* positivo, mientras que no se ha alcanzado para el grupo *SLUG* negativo, con un valor de HR de 2,30 (p,013). Es decir, que el tener *SLUG* positivo supone aproximadamente el doble de probabilidad de muerte respecto a tenerlo negativo. El estudio de Shiori et al, ya comentado anteriormente, también reflejó una peor supervivencia global para los pacientes con expresión de *SLUG*, en este caso detectada por inmunohistoquímica (HR 3,367; p,0001)<sup>182</sup>. En la misma línea, el trabajo de Toiyama et al, también citado previamente, evidenció que los enfermos con alta expresión de *SLUG* tenían menor supervivencia global (HR 2,96; p,0001)<sup>183</sup>.

En nuestra serie, consideramos interesante analizar la mortalidad causa-específica (por CCR) ya que 11 pacientes con CCR localizado fallecieron por otras causas, lo que supone un 30,6% de las muertes en este grupo. En este caso, los resultados están al límite de la significación estadística (HR 2,16; p,057).

Sin embargo, hay que destacar que 5 de esos 11 pacientes murieron por otro tipo de tumor por lo que en realidad sólo 6 pacientes del grupo de CCR localizado fallecieron por causa no oncológica. Ante esta situación, decidimos explorar la SG considerando a los pacientes que murieron por cáncer

(considerando censurados a los 6 que fallecieron sin evidencia de tumor) y así los resultados vuelven a ser estadísticamente significativos y son aún más llamativos (HR 2,77; p,005). Esto puede ser debido a que en esos otros tipos de tumores, distintos al CCR, *SLUG* también sea un marcador de mal pronóstico. Así lo evidencian diversos autores, como Martin et al en cáncer de mama<sup>164</sup>, Cappelleso et al y Zhang et al en carcinoma escamoso de cabeza y cuello<sup>170,171</sup>, Uchikado et al (2005) en carcinoma escamoso esofágico<sup>172</sup>, Kihara et al en carcinoma endometrial<sup>176</sup> y más recientemente Pulkka et al (2017) en GIST<sup>179</sup>. En concreto en los tipos de tumores (distintos a CCR) que fueron causa de muerte en los pacientes de nuestro estudio también disponemos de evidencia del valor de *SLUG* como factor de mal pronóstico: Por una parte, los estudios de Shih et al<sup>167</sup>, Merikallio et al<sup>168</sup> y Atmaca et al<sup>169</sup> en cáncer de pulmón no microcítico y, por otra parte, el trabajo de Uchikado et al (2011) en cáncer gástrico<sup>173</sup>.

Por otro lado, en el campo de las CTCs también disponemos de evidencia de que su detección es factor pronóstico para la SG de los pacientes con CCR localizado. En primer lugar, según Jia et al. las CTCs detectadas en el preoperatorio representan un factor pronóstico válido para progresión tumoral y supervivencia<sup>208</sup>. En nuestro trabajo no hemos analizado este escenario, ya que los pacientes con enfermedad localizada fueron incluidos tras resección del tumor primario. En segundo lugar, en el contexto de la detección de CTCs tras resección con intención curativa, ya hemos mencionado con anterioridad los datos de Uen y Lu, en los que dicha detección se asociaba a una menor SLE, y también se relaciona con una menor SG<sup>210,211</sup>. Y, en tercer lugar, según los análisis de Lu et al la persistencia de CTCs tras quimioterapia adyuvante es un marcador potencial para determinar la evolución clínica de los pacientes con CCR<sup>212</sup>. En nuestro estudio, el número de pacientes con disponibilidad de una segunda muestra de sangre periférica, tras el tratamiento adyuvante, es pequeño, por lo que no hemos podido analizar esta cuestión.

A diferencia de los resultados obtenidos con *SLUG*, en el **análisis de SG realizado en función de la expresión de E-cadherina** no evidenciamos diferencias significativas. Otros autores han analizado la relación entre E-

cadherina y la supervivencia de los pacientes con CCR: Los datos de Dorudi et al (1995) apoyan que aquellos pacientes con mayores niveles de RNA mensajero de E-cadherina, obtenidos mediante hibridación *in situ*, tendrían una mayor supervivencia a 5 años<sup>112</sup>. Si bien, como los propios autores reflejan en su publicación, se trata de un estudio con pocos pacientes (N=49) y retrospectivo, por lo que estos datos requerirían validación en un estudio prospectivo y con mayor número de muestras. También se ha estudiado la expresión de E-cadherina en el contexto de otras moléculas de la vía de señalización Wnt y la supervivencia de pacientes con CCR, como en el trabajo de Lugli et al<sup>113</sup>. En este caso, mediante microarrays, los autores encontraron asociación entre el incremento de expresión nuclear de  $\beta$ -catenina y la pérdida de expresión de membrana de E-cadherina con una peor supervivencia en los tumores sin inestabilidad e microsatélites. En el caso de nuestro trabajo, en el que no hemos encontrado influencia de la expresión de E-cadherina sobre la supervivencia de los pacientes, también hemos de tener en cuenta las limitaciones en cuanto a tamaño muestral y la diferente técnica de detección.

Al estudiar **la influencia de la expresión de ambas variables, *SLUG* y E-cadherina, de manera conjunta, sobre la SG de los pacientes con CCR localizado**, destaca la importante diferencia entre las medianas de SG: 146,53 meses para el grupo *SLUG* negativo y E-cadherina positiva, frente a 77,47 meses para el grupo *SLUG* positivo y E-cadherina negativa. Sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos (HR 1,80; p,368)

En el grupo de pacientes con **CCR metastásico**, también estudiamos la **relación de *SLUG* con otras variables pronósticas**. En primer lugar, analizamos la posible conexión entre la expresión de *SLUG* y el número de localizaciones metastásicas, observando que el tener metástasis en 2 o más localizaciones aumenta la probabilidad de detección de *SLUG* positivo (OR 3,46; p,048). A continuación, estudiamos la correlación de la expresión de *SLUG* con la localización hepática de las metástasis: De los pacientes con CCR avanzado y *SLUG* positivo un 72,7% tenían afectación hepática, mientras que entre los *SLUG* negativos el porcentaje era 37,5%. Podemos afirmar que en nuestros pacientes existe una correlación entre la localización hepática de las metástasis y *SLUG* positivo, siendo la OR 4,44 (p, 006). También existe una relación entre

el número de líneas de tratamiento y la expresión de *SLUG* en sangre periférica (OR 8,40; p,002) Como las variables anteriores (número de localizaciones metastásicas y afectación hepática) esta variable viene a reflejar que cuanto más avanzada está la enfermedad más probable es que detectemos *SLUG*.

Alguno de los trabajos ya mencionados con anterioridad, como el de Toiyama et al, también relacionó la expresión de *SLUG* con factores pronósticos en enfermedad avanzada, por ejemplo la presencia de metástasis hepáticas (p,027)<sup>183</sup>.

Así mismo, es objeto de nuestro estudio el **análisis de supervivencia en los pacientes con CCR metastásico en función de la expresión de *SLUG***. En el caso de la **SLP**, observamos una diferencia estadísticamente significativa, siendo la mediana del grupo de pacientes con *SLUG* negativo el doble que la del grupo con *SLUG* positivo (8,0 vs 4,0 meses) con una HR de 1,94 (p,012). Podríamos decir que la detección de *SLUG* aumenta la probabilidad de progresión casi el doble respecto a no expresarlo.

Por último, investigamos la posible influencia de la detección de *SLUG* sobre la **SG** de los pacientes con enfermedad avanzada, pero en este análisis no hemos obtenido diferencias significativas entre ambos grupos.

En el metaanálisis realizado por Huang et al, publicado en 2016, se incluyeron 29 estudios en diferentes tumores, y se concluyó que la alta expresión de *SLUG* detectada mediante inmunohistoquímica (23 estudios) indicaba peor pronóstico en términos de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de progresión<sup>185</sup>. Sin embargo, los resultados no fueron los mismos al analizar los datos de los 6 estudios en los que la expresión de *SLUG* se había detectado mediante RT-PCR cuantitativa<sup>185</sup>. Esto nos lleva a pensar que el método de detección puede influir en los resultados obtenidos. En la mayoría de los estudios publicados sobre *SLUG* en CCR la detección se ha realizado mediante inmunohistoquímica, sobre el tejido tumoral, mientras que en el nuestro se ha empleado la detección mediante RT-PCR en sangre periférica.

En CCR metastásico, según los datos de importantes estudios, las CTCs son marcadores predictivos para la quimioterapia, discriminando prematuramente las potenciales metástasis, seleccionando pacientes resistentes al tratamiento y determinando la evolución clínica. Al ser un marcador pronóstico, las CTCs pueden servir para una mejor monitorización de enfermedad en determinados casos de CCR metastásico en los que los niveles de CEA y otros marcadores no se alteren. Además, los niveles elevados de CTCs se asocian a peor supervivencia libre de progresión y peor supervivencia global en pacientes con CCR<sup>200,204,213</sup>.

Por otra parte, la TEM es un proceso por el que las CTCs adquieren capacidad para favorecer las metástasis. En pacientes con CCR metastásico, examinando en las CTCs la expresión de genes relacionados con la TEM e implicados en la migración celular, se ha observado correlación con la supervivencia global y libre de progresión<sup>214,215</sup>. En concreto el reciente trabajo de Ning et al estudió la expresión de mRNA de marcadores de TEM (*PI3K $\alpha$* , *Akt-2* y *Twist1*) y concluyó que la expresión de Akt-2 puede ser un marcador pronóstico útil en CCR metastásico<sup>215</sup>.

Para fortalecer el argumento de que las CTCs pueden ser marcadores de apoyo, se han realizado varios estudios en pacientes con CCR metastásico tratados con quimioterapia, detectando las CTCs en diferentes momentos de la evolución y estudiando su correlación con la respuesta al tratamiento, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global<sup>217-223</sup>.

En la mayoría de ellos (Cohen et al, 2008; Tol et al, 2010; Matsusaka et al, 2011 y Sastre et al, 2012) el método de detección de las CTCs empleado ha sido CellSearch System<sup>217-221</sup>. En los demás se han empleado otros procedimientos con enriquecimiento inmunomagnético (De Albuquerque et al, 2012) o paneles de detección multimarcador (Barbazan, 2014)<sup>222,223</sup>. Los esquemas de tratamiento fueron heterogéneos en varios (Cohen et al<sup>217</sup>, Albuquerque et al<sup>222</sup>, Barbazan et al<sup>223</sup>) y más homogéneos en otros (XELOX + bevacizumab +/- cetuximab en el de Tol et al<sup>219</sup>, FOLFOX4 +/- bevacizumab en el de Matsusaka et al<sup>220</sup>, XELOX + bevacizumab en el de Sastre et al<sup>221</sup>). En todos estos estudios los niveles de CTCs resultaron ser predictores de la SLP y

SG de los pacientes (salvo en el estudio de Albuquerque<sup>222</sup>, en el que sólo tenemos datos de SLP y no de SG)

Sin embargo, hay discordancias entre los tratamientos de los pacientes, los tiempos de recogida de las muestras, el valor de referencia de los niveles de CTCs, los métodos de detección y las técnicas de imagen empleadas para evaluar la enfermedad. Incluso estando claro que las CTCs reflejan la respuesta al tratamiento, es necesario unificar criterios para fortalecer su importancia como marcadores útiles en la práctica clínica<sup>203</sup>.

### **Limitaciones de nuestro estudio:**

Debido a la antigüedad de las muestras histológicas, hay factores patológicos que no estaban reflejados en los informes y que actualmente se consideran indispensables, como la infiltración linfovascular y perineural. Además, no teníamos disponible el dato del grado histológico en todos los informes anatomopatológicos.

También debido al estado de preservación de algunas de esas muestras, al tratarse de un análisis retrospectivo, es posible que el estudio de E-cadherina no tenga la validez que tendría si se realizase sobre muestras recientes. Esto podría explicar la baja expresión de E-cadherina que se ha encontrado en las muestras de nuestro estudio.

Hay otros factores pronósticos establecidos actualmente que no se han analizado en nuestro trabajo debido a que en el momento en que se realizó la recogida de datos y el análisis de las muestras aún no eran características a considerar, como por ejemplo la expresión de los genes MMR.

En cuanto a los factores pronósticos clínicos, una limitación ha sido no disponer en todos los pacientes con CCR localizado del valor de CEA.

Diversos autores además de demostrar que la expresión de E-cadherina está disminuida en el CCR, han estudiado también la expresión de otras moléculas implicadas en la adhesión, como las cateninas. En nuestro estudio



solamente hemos estudiado E-cadherina, sin tener datos de la expresión de cateninas u otras moléculas implicadas en la adhesión celular.

El no disponer de una segunda muestra para detección de *SLUG* en todos los pacientes con CCR localizado al finalizar la adyuvancia ha impedido valorar el efecto del tratamiento sobre su expresión.

Debido a que la población de pacientes con CCR metastásico incluida en nuestro estudio era heterogénea, con la extracción de muestra para detección de *SLUG* en distintos momentos evolutivos (distintas líneas de tratamiento, distintos esquemas de quimioterapia recibidos...) y a que no en todos ellos disponíamos de una segunda muestra para detección de *SLUG*, tampoco hemos podido establecer la influencia del tratamiento sobre su expresión.

A pesar de las limitaciones descritas, queremos destacar algunas **fortalezas** de nuestro trabajo, como las siguientes: El estudio está realizado con pacientes de la práctica clínica diaria, seleccionando aquellos que tenían realizada la extracción de sangre periférica en un momento adecuado para que la población fuera lo más homogénea posible, todas las muestras han sido estudiadas en el mismo laboratorio y con la misma técnica (las histológicas en el mismo Servicio de Anatomía Patológica y las de sangre periférica en el mismo laboratorio de Biología Molecular) y hemos realizado un largo seguimiento de los pacientes que nos ha permitido obtener datos de supervivencia.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

El análisis de los resultados de este estudio, nos permite, a nuestro juicio, formular las siguientes conclusiones:

1. La detección de *SLUG* en sangre periférica es más frecuente en los pacientes con cáncer colorrectal metastásico que en aquellos con cáncer colorrectal localizado.
2. En nuestro estudio, existe relación entre la expresión de *SLUG* y la extensión metastásica de la enfermedad.
3. En nuestra serie, la detección de *SLUG* no se relaciona con otras variables de interés pronóstico analizadas en los pacientes con cáncer colorrectal localizado.
4. En las muestras de cáncer colorrectal localizado incluidas en este trabajo, la expresión de E-cadherina se relaciona con el grado histológico, asociándose a tumores de bajo grado.
5. En el presente estudio, no hemos observado relación entre la detección de *SLUG* en sangre periférica y la expresión de E-cadherina en tejido tumoral de los pacientes con cáncer colorrectal estadio I-III.
6. La detección de *SLUG* es un factor que podría determinar una peor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con cáncer colorrectal localizado de nuestra serie.
7. En nuestro trabajo, la detección de *SLUG* determina una peor supervivencia global en los pacientes con cáncer colorrectal localizado.

8. En la presente serie, no hemos observado influencia de la expresión de E-cadherina sobre la supervivencia libre de enfermedad ni sobre la supervivencia global de los pacientes con cáncer colorrectal localizado.
9. Al analizar la influencia conjunta de ambas variables, *SLUG* y E-cadherina, sobre la supervivencia, no hemos obtenido resultados estadísticamente significativos.
10. En nuestro análisis, la detección de *SLUG* se relaciona con otras variables pronósticas en cáncer colorrectal metastásico: el número de localizaciones metastásicas, la presencia de metástasis hepáticas y el número de líneas de tratamiento.
11. La detección de *SLUG* determina una peor supervivencia libre de progresión en los pacientes con cáncer colorrectal avanzado incluidos en el presente trabajo.
12. En nuestros resultados no hemos observado influencia de la detección de *SLUG* en sangre periférica en la supervivencia global de los pacientes con cáncer colorrectal metastásico.

# BIBLIOGRAFÍA





# BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer (IARC). World Health Organization (WHO) Disponible en: <http://www.globocan.iarc.fr> [Consultado en enero de 2018]
2. Las cifras del cáncer en España 2017. SEOM. Disponible en: <http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las-cifras-del-cancer-en-Esp-2017> [Consultado en abril de 2018]
3. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, Regional and National Cancer Incidence Mortality Years of Life Lost, Years Lived With Disability and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. JAMA Oncol. 2017;3:524.
4. Libutti SK, Saltz LB, Willet CG and LEvine RA. Cancer of the Colon. En: De Vita VT, Hellman S and Rosenberg SA. Cancer: Principles & Practice of Oncology. 10th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015. p 768-812.
5. Cabanes A, Vidal E, Aragones N, et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. Ann Oncol 210;21 Suppl 3:iii14-20.
6. Macrae FA. Colorectal cáncer: Epidemiology, risk factors and protective factors. En: UpToDate, Goldberg RM, Seres D, Savarese SMF (eds.) Jan 17, 2018. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors> [Consultado en febrero de 2018]
7. Fonseca Sánchez E, Vidal Tocino R. Cáncer de colon y recto. En: Cruz Hernández JJ, Rodríguez Sánchez CA, Del Barco Morillo E y Fonseca Sánchez E (Eds). Oncología Clínica . 6ª ed. Barcelona: Elsevier;2018. p 191-199.
8. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2002-2006. Disponible en: <http://seer.cancer.gov>
9. Tuohy TM, Rowe KG, Mineau GP, et al. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. Cancer 2014;120(1):35-42.
10. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas.N Engl J Med. 1992;326(10):658.

11. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1990;323(18):1228.
12. Freeman HJ. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2008;14(12):1910-1.
13. Nottage K, McFarlane J, Krasin MJ, et al. Secondary colorectal carcinoma after childhood cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(20):2552.
14. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *Cancer J Clin*. 2010;60(5):277.
15. Fukuda I, Hizuka N, Murakami Y, et al. Clinical features and therapeutic outcomes of 65 patients with acromegaly at Tokyo Women's Medical University. *Intern Med*. 2001;40(10):987.
16. Giovannucci E and Willett WC. Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 1994;26:443-52.
17. Bruce WR, Giacca A and Medline A. Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 200;9:1271-9.
18. Willett WC. Diet and Cancer: One view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:3-8.
19. Cross AJ, Ferrucci LM, Risch A, et al. A large prospective study of meat consumption and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res*. 2010;70(6):2406.
20. Chan DS, Lau R, Aune D, Vieira R, et al. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: meta-analysis of prospective studies. *PLoS One* 2011;6(6):e20456.
21. Carcinogenicidad del consumo de carne roja y de la carne procesada. Organización Mundial de la Salud. Octubre 2015. Disponible en: <http://www.who.int>
22. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Report. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Colorectal Cancer. 2011. Disponible en: <http://www.dietandcancerreport.org>
23. LoConte NK, Brewster AM, Kaur JS, et al. Alcohol and Cancer: A Statement of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2018;36:83.
24. Karahalios A, English DR, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2015;181(11):832-45.

25. De Bruijn KM, Arends LR, Hansen BE, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer. *Br J Surg*. 2013;100(11):1421-9.
26. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, et al. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA*. 2008;300(23):2765.
27. Stewart M, Macrae FA, Williams CB. Neoplasia and ureterosigmoidostomy: a colonoscopy survey. *Br J Surg*. 1982;69(7):414.
28. Frucht H, Lucas AL. Molecular genetics of colorectal cáncer. En: UpToDate, Goldberg RM, Raby BA, Savarese DMF (eds.) Feb 08, 2018. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/molecular-genetics-of-colorectal-cancer> [Consultado en febrero de 2018]
29. O'Brien MJ, Winawer SJ, Waye JB. Colorectal popyps. En: Management of Gastrointestinal Diseases, Winawer SJ (Ed). Gower Medical, New York, 1992.
30. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61(5):759.
31. Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;16:775.
32. Takayama T, Ohi M, Hayashi T et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*. 2001;121(3):599.
33. Goss KH, Groden J. Biology of adenomatous polyposis coli tumor supressor. *J Clin Oncol* 2000;18:1967.
34. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525.
35. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. 1990;247(4938):49.
36. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology*. 1995;109(5):1685.
37. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(22):5248.
38. Macrae FA, Bendell J. Clinical presentation, diagnosis, and staging of colorectal cancer. En: UpToDate, Tanabe KK, Savarese DMF, Grover S (eds.). Mar 02, 2018. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-diagnosis-and-staging-of-colorectal-cancer> [Consultado en marzo de 2018]

39. Compton CC. Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer. En: UpToDate, Tanabe K, Savarese SMF (eds) Mar 30, 2018. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/pathology-and-prognostic-determinants-of-colorectal-cancer> [Consultado en abril de 2018]
40. Halmiton SR, Bosman FT, Boffeta P, et al. Criteria for histological grading of colorectal adenocarcinomas. En: World Health Organization Classification of Tumours of the Digestive System. 4<sup>th</sup> edition. World Health Organization. 2010.
41. Moll R, Zimbelmann R, Goldschmidt MD, et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 1993;53:75.
42. Werling RW, YAziji H, Bacchi CE, et al. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Pathol* 2003;27:303.
43. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008;10:293.
44. Liu Z, Zhang Y, Niu Y, et al. A systematic review and meta-analysis of diagnostic and prognostic serum biomarkers of colorectal cancer. *PLos One* 2014;9:e103910.
45. Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *JClin Oncol* 2006;24:5313.
46. Konishi T, Shimada Y, Hsu M, et al. Association of preoperative and postoperative serum carcinoembryonic antigen and colon cancer outcome. *JAMA Oncol* 2018;4:309.
47. AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition (2017), Springer Science and Business Media LLC. Disponible en: [www.springer.com](http://www.springer.com).
48. Holme O, Bretthauer M, Fretheim A, et al. Flexible sigmoidoscopy versus faecal occult blood testing for colorectal cancer screening in asymptomatic individuals. *Cochrane Database Syst Rev* 2013: CD009259.
49. Shaukat A, Mongin SJ, Geisser MS et al. Long-term mortality after screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013;369:1106.
50. Shoen RE, Pinsky PF, Wissfeld JL, et al. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Engl J Med* 2012;366:2345.

51. Atkin W, Wooldrage K, Pakin DM, et al. Long term effects of once-only flexible sigmoidoscopy screening after 17 years follow-up the UK Flexible Sigmoidoscopy Screening randomized controlled trial. *Lancet* 2017;389:1299.
52. Bonis PA, Ahnen DJ, Axell L. Lynch síndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): Screening and management. En: UpToDate, Lamont JT, Goff B, Grover S. May 12, 2016. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/lynch-syndrome-hereditary-nonpolyposis-colorectal-cancer-screening-and-management> [Consultado en febrero de 2018]
53. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) 1973-2005 Public Use File. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/data>
54. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, et al. Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2016;3:211.
55. Wolmark N, Fisher B, Wieand HS, et al. The prognostic significance of preoperative carcinoembryonic antigen levels in colorectal cancer. Results from NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) clinical trials. *Ann Surg* 1984;199:375.
56. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, et al. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcomes in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *Ann Surg Oncol* 2009;16:3087.
57. Thirunavukarasu P, Sukumar S, Sathaiah M, et al. C-stage in colon cancer: implications of carcinoembryonic antigen biomarker in staging, prognosis, and management. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:689.
58. Kim CG, Ahn JB, Jung M, et al. Preoperative serum carcinoembryonic antigen level as a prognostic factor for recurrence and survival after curative resection followed by adjuvant chemotherapy in stage III colon cancer. *Ann Surg Oncol* 2017;24:227.
59. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colon Cancer. v. 2.2018. Disponible en: <https://www.nccn.org> [Consultado en marzo de 2018]
60. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO Consensus Guidelines: Management of patients with colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016;27:1386-1422.
61. Venock AP and Curley SA. Management of potentially resectable colorectal cancer liver metastasis. En: UpToDate, Tanabe KK, Savarese SM. Feb 19, 2018. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/management-of-potentially-resectable-colorectal-liver-metastases> [Consultado en marzo de 2018]
62. Kopetz S, Vauthey JN. Perioperative chemotherapy for resectable hepatic metastasis. *Lancet* 2008;371:963.

63. Rodríguez-Bigas MA, Grothey A. Overview of the management of primary colon cancer. En: UpToDate, Tanabe KK, Goldberg RM, Savarese DM (eds.) Mar 30, 2018. Disponible en: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-management-of-primary-colo-cancer> [Consultado en abril de 2018]
64. Figueredo A, Charette ML, Maroun J, et al. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *J Clin Oncol* 2004;22:3395.
65. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004;22:1797.
66. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343
67. André T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009;29:3768.
68. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:1465.
69. Cruz Hernández JJ y González Sarmiento R. Biología celular y molecular del cáncer. En: Cruz Hernández JJ, Rodríguez Sánchez CA, Del Barco Morillo E, Fonseca Sánchez. *Oncología Clínica*. 6ª edición. Barcelona: Elsevier; 2018; p. 5-11.
70. Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. What defines a useful marker of metastasis in human cancer? *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(16):1351-3.
71. Engers R, Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(12):682-92
72. Del Barco E. Detección de células tumorales aisladas en sangre periférica de pacientes con cáncer de mama mediante la expresión de SNAI-2 (SLUG): Correlación con variables patológicas, implicaciones pronósticas y evaluación de su valor como nuevo marcador molecular en cáncer de mama [Tesis Doctoral] Salamanca: Universidad de Salamanca; 2006.
73. Till JE, McCulloch EA and Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964;51(1)29-36.
74. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004;23:7274-7282.

75. Houghton JM, Morozov A, Smirnova I and Wang TC. Stem cells and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2007;17:191-203.
76. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, et al. Snail is required for TGFbeta-induced endotelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endotelial cells. *J Cell Sci*. 2008;121:3317-3324.
77. Reya T, Norrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cell, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111.
78. Dean M, Fojo T and Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer* 2005;5:275-284.
79. Greaves M and Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481:306-313
80. Folkman J. Tumor angiogénesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186.
81. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* 1996; 69:135-74.
82. Compagni A, Christofori G. Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 2000; 83(1):1-5.
83. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997; 80(8 Suppl):1529-37.
84. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
85. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Oct;17(5):548-58.
86. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; 251:1451-145.
87. Boegenrieder T., and Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 6524-36.
88. Perez-Moreno M, Jamora C., and Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 2003; 112: 535-48.
89. Cavallaro U and Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:118-132.
90. Hedrick L, Cho K, Vogelein B. Cell adhesion as tumor suppressors. *Trends Cell Biol* 1993; 3:36-9.
91. Berx G, Staes K, van Hengel J, et al. Cloning and characterization of the human invasión supresor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 1995;26(2):281-289.
92. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherina mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 1996; 77: 1605-1613.

93. Hirohashi S. Inactivation of E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153: 333-339.
94. Kuphal S, Poser I, Jobin C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma. *Oncogene* 2004; 4;23(52):8509-19.
95. Berx G and van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a003129.
96. Berx G., and van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 289-93.
97. Harigopal M, Berger AJ, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. Automated QuantitativeAnalysis of ECadherin Expression in Lymph NodeMetastases Is Predictive of Survival in Invasive Ductal Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:11.
98. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, et al. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer research* 1994;54:3929-3933.
99. Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, et al. E-cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, parafin-embedded tissues: Correlation with histopathological grade, tumor stage and survival. *Int J Cancer* 1995;64(6):367-370.
100. García del Muro X, Torregrosa A, Muñoz J, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer* 2000;36(3)357-362.
101. Von Wasielewski R, Rhein A, Werner M, et al. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997;57:2501-2507.
102. Sawada K, Mitra AK, Radjabi AR, et al. Loss of E-cadherin promotes ovarian cancer metástasis via  $\alpha$ -5-integrin, which is a therapeutic target. *Cancer Res* 2008;68(7):2329-2339.
103. Gabbert HE, Mueller W, Schneiders A, et al. Prognostic value of E-cadherin expression in 413 gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1996;69(3):184-189.
104. Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, et al. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* 1994;174:243-248.
105. Gagliardi G, Kandemir O, Liu D, et al. Changes in E-cadherin immunoreactivity in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. *Virchows Arch* 1995;426:149-154.



106. Ngan CY, Yamamoto H, Seshimo I, et al. A multivariate analysis of adhesion molecules expression in assessment of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2007;15:652-662.
107. Hiscox S and Jiang WG. Expression of E-cadherin, alpha, beta and gamma-catenin in human colorectal cancer. *Anticancer Res* 1997;1349-13545.
108. El-Bahrawy MA, Poulson R, Jeffery R, et al. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:1216-1224.
109. Cavallaro V, Schaffhauser B and Christofory G. Cadherins and the tumor progression: is it all in a switch. *Cancer let* 202;176:123-128.
110. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442–454.
111. Karatzas G, Karayannakis AJ, Syrigos KN, et al. E-cadherin expression correlates with tumor differentiation in colorectal cancer. *Hepato-Gastroenterology* 1999;46:232-235.
112. Dorudi S, Hanby AM, Poulson R, et al. Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *Br J Cancer* 1995;71:614-616.
113. Lugli A, Zlobec I, Minoo P, et al. Prognostic significance of the Wnt signaling pathway molecules APC,  $\beta$ -catenin and E-cadherin in colorectal cancer- a tissue microarray-based analysis. *Histopathology* 2007;50(4):453-464.
114. Karamitopoulou E, Zlobec I, Patsouris ES, et al. Loss of E-cadherin independently predicts the lymph node status in colorectal cancer. *Pathology* 2011;43(2):133-137.
115. Jie D, Zhongmin Z, Guoqing L, et al. Positive expression of LSD1 and negative expression of E-cadherin correlate with metastasis and poor prognosis of colon cancer. *Dig Dis Sci* 2013;58(6):1581-1589.
116. Laurel L, Aantos C, Butz S, et al. A role for cadherins in tissue formation. *Development* 1996; 122: 3185-3194.
117. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 12; 392:190-193.
118. Batsche E, Muchardt C, Behrens J, Hurts HC, and Cremisi C. RB and c-Myc activate expression of the E-cadherin gene in epithelial cell through interaction with transcriptional factor AP-2. *Mol Cell Biol* 1998; 18:3647-3658.
119. Hosono S, Gross I, English MA, et al. E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem* 2000; 276:10943-10953.

120. García H, González JM, Espada J, et al. Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carcinoma cells by induction of E-cadherin and the inhibition of  $\beta$ -catenin signaling. *J. Cell Biol* 2001; 154: 369-387.
121. Peinado H Portillo F and Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogénesis. *Int J Dev Biol* 2004;48:365-375.
122. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, et al. The transcription factor SLUG represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci* 2003; 116: 499-511.
123. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol* 2000; 2: 76-83.
124. Batlle, E, Sancho E, Francí C, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biol.* 2000; 2:84–89.
125. Peinado H, Ballester E, Esteller M and Cano A. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 2004;24(1):306-319.
126. Barrallo-Gimeno A and Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005; 132: 3151-3161.
127. Behrens J, Frixen U, Schipper J, Weidner M, Birchmeier W. Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin Cell Biol.* 1992; 3(3):169-78
128. Lauffenburger DA, Horowitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359.
129. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001;411(6835):375-9.
130. Boulay JL, Dennefeld C and Alberga A. The Drosophila developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* 1987; 330, 395-398.
131. HUGO Gene Nomenclature Committe. <http://www.genenames.org>
132. Cohen ME, Yin M, Paznekas WA, et al. Human SLUG gene organization, expression, and chromosome map location on 8q. *Genomics* 1998; 51(3):468–471.
133. Sánchez-Martín M, González-Herrero I, Sánchez-García I . SNAI2 (snail homolog 2) Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2004;8(2):78-80.

134. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion Cell Biol* 2003; 15 (6): 740-746.
135. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:155–166.
136. Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, et al. Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 2003;22(4):891-8.
137. Perez-Mancera PA, Gonzalez-Herrero I, Perez-Caro M, et al. SLUG in cancer development. *Oncogene*. 2005;24(19):3073-82.
138. Perez-Mancera PA, Perez-Caro M, Gonzalez-Herrero I, et al. Cancer development induced by graded expression of Snail in mice. *Hum Mol Genet*. 2005; 5: 3449-3461.
139. Franci C, Takkunen M, Dave N, et al. Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 2006; 25, pages5134–5144.
140. De Craene B, Gilbert B, Stove C, et al. The transcription factor SNAIL induces tumor cell invasion through modulation of the epithelial cell differentiation program. *Cancer Res*. 2005; Jul 15;65(14):6237-44.
141. Ohkubo T, Ozawa M. The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci*. 2004; Apr 1;117(Pt 9):1675-85.
142. Peinado H, Marin F, Cubillo E, et al. SNAIL and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J. Cell Sci* 2004; 117(13): 2827 – 2839.
143. Yañez-Mo, M., Lara-Pezzi, E., Selgas, R., et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *New Engl. J Med*. 2003; 348: 403-413.
144. Sato, M., Muragaki, Y., Saika, S., Roberts, A. B. and Ooshima, A. Targeted disruption of TGFbeta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J. Clin. Invest*. 2000; 112: 1486-1494.
145. Savagner, P., Kusewitt, D., Carver, et al. Developmental transcription factor SLUG is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J. Cell. Physiol*. 2005; 202: 858-866.
146. Tribulo C, Aybar MJ, Sanchez SS, et al. A balance between the anti-apoptotic activity of Slug and the apoptotic activity of msx1 is required for the proper development of the neural crest. *Dev Biol*. 2004; 15;275(2):325-42.

147. Martinez-Alvarez C., Blanco M. J., Perez R., et al. Snail family members and cell survival in physiological and pathological cleft palates. *Dev. Biol.* 2004; 265: 207-218.
148. Roy, H. K., Iversen, P., Hart, J., Liu, Y., Koetsier, J. L., Kim, Y., Kunte, D. P., Madugula, M., Backman, V. and Wali, R. K. Downregulation of SNAIL suppresses MIN mouse tumorigenesis: modulation of apoptosis, proliferation, and fractal dimension. *Mol. Cancer Ther.* 2004; 3: 1159-1165.
149. Inukai T., Inoue A., Kurosawa H., et al. SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol. Cell* 1999; 4: 343-352.
150. Leroy P., Mostov K. SLUG (Snail2) is an antiapoptotic factor during tubulogenesis of MDCK cells. S. 2nd International Meeting on Epithelial Mesenchymal Transition, October 1-3, 2005.
151. Kajita M., McClinic K. N. and Wade P. A. Aberrant expression of the transcription factors SNAIL and SLUG alters the response to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol.* 2004; 24: 7559-756.
152. Vega S., Morales A. V., Ocana O. H., et al. SNAIL blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 2004; 18: 1131-1143.
153. Lapidot, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367, 645-648.
154. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med.* 1997; 3, 730-737.
155. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110.
156. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111–115.
157. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 2007; 449: 1003–1007.
158. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 389-402.
159. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, et al. Colon cancer stem cells: Controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 2997-3006.
160. Tu SM, Lin SH, Logothetis CJ. Stem cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumors. *Lancet Oncol* 2002; 3: 508-13.

161. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev* 2003; 3: 895-902.
162. Spillane JB and Henderson MA. Cancer Stem Cells: A review. *J Surg* 2007; 77; 464-468.
163. Cheng CW, Wu PE, Yu JC, et al. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene* 2001;20:3814–3823.
164. Martin TA, Goyal A, Watkins G, et al. Expression of the transcription factors SNAIL, SLUG, and TWIST and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005; Jun;12(6):488-96.
165. Blanco M. J., Moreno-Bueno G., Sarrio D., et al. Correlation of SNAIL expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002; 21: 3241-3246.
166. Moody SE, Perez D, Pan TC, et al. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence *Cancer Cell*. 2005; Sep;8(3):197-209.
167. Shih JY, Tsai MF, Chang TH, et al. Transcription repressor SLUG promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005; Nov 15;11(22):8070-8.
168. Merikallio H, Pääkkö P, Mäkitaro R, et al. Slug is associated with poor survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):5846-54.
169. Atmaca A, Wirtz RW, Werner D, et al. SNAI2/SLUG and estrogen receptor mRNA expression are inversely correlated and prognostic of patient outcome in metastatic non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:300.
170. Cappellesso R, Marioni G, Crescenzi M, et al. The prognostic role of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2015;67(4):491-500.
171. Zhang J, Cheng Q, Zhou Y, et al. Slug is a key mediator of hypoxia induced cadherin switch in HNSCC: correlations with poor prognosis. *Oral Oncol*. 2013 Nov;49(11):1043-50.
172. Uchikado Y., Natsugoe S., Okumura H., et al. SLUG expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2005; 11: 1174-1180.
173. Uchikado Y, Okumura H, Ishigami S, et al. Increased Slug and decreased E-cadherin expression is related to poor prognosis in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2011;14(1):41-9.

174. Miyoshi A., Kitajima Y., Kido S., et al. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 2005; 92: 252-258.
175. Mikami S, Katsube K, Oya M, et al. Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Lab Invest.* 2011;91(10):1443-58.
176. Kihara A, Wakana K, Kubota T, Kitagawa M. SLUG expression is an indicator of tumour recurrence in high-grade endometrial carcinomas. *Histopathology* 2016 Sep;69(3):374-82.
177. Zhang T, Chen XU, Chu X, et al. Slug overexpression is associated with poor prognosis in thymoma patients. *Oncol Lett.* 2016 Jan;11(1):306-310. Epub 2015.
178. Saito T., Oda Y., Kawaguchi K., et al. Ecadherin mutation and Snail overexpression as alternative mechanisms of Ecadherin inactivation in synovial sarcoma. *Oncogene* 2004; 23: 8629-8638.
179. Pulkka OP, Nilsson B, Sarlomo-Rikala M, et al. SLUG transcription factor: a pro-survival and prognostic factor in gastrointestinal stromal tumour. *Br J Cancer* 2017; 116, 1195–1202.
180. Palmer H. G., Larriba M. J., Garcia J. M., et al. The transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat. Med.* 2004; 10:917- 919.
181. Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, et al. The Transcriptional Repressor SNAIL Is Overexpressed in Human Colon Cancer. *Dig Dis Sci* 2005;50(1):42-46.
182. Shiori M, Shida T, Koda K et al. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2006; 94; 1816-182.
183. Toiyama Y, Yasuda H, Saigusa S, et al. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2013;34(11):2548-57.
184. Feride Kroepil F, Fluegen G, Vallböhmer D, et al. Snail1 expression in colorectal cancer and its correlation with clinical and pathological parameters. *BMC Cancer* 2013;13:145.
185. Huang C, Zhang P, Zhang D, Weng X .The prognostic implication of slug in all tumour patients - a systematic meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2016;46(5):398-407.

186. Cruz JJ, Soto-Rosa E, Ocaña-Fernandez A, et al. Correlation of peripheral blood SNAI2 expression with the metastatic potential in breast carcinomas. *Ann Oncol* 2004; 15 Abstrac 54 PD.
187. Cruz JJ, Nava MA, del Barco E, et al. Micrometastases detection using SNAI-1 and SNAI-2 as biomarkers of dissemination in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; Abst. 9686.
188. Del Barco E, Nava MA, Rodríguez CA, et al. Expresión de Snai-1 y Snai-2 en pacientes con cáncer de mama como marcador molecular de micrometástasis en sangre periférica. *Clinical and Translational Oncology*, Junio 2005; Vol 7: 18 (PD-1)
189. Sanson M. Diathèse cancéreuse. *Gaz Med de Paris* 1834;2:140.
190. Asworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869; 14: 146.
191. Ryall C. The technique of cancer operations, with reference to the danger of cancer infection. *BMJ* 1908; 2: 1005–8.
192. Engell HC. Cancer cells in the circulating blood; a clinical study on the occurrence of cancer cells in the peripheral blood and in venous blood draining the tumour area at operation. *Acta Chir Scand Suppl.* 1955;201:1-70.
193. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, et al. Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987; 237: 175-178.
194. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al. Specific detection of carcinoembryonic antigenexpressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994;12: 725–729.
195. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999; 86: 2668-73.
196. Benoy IH., Elst H., Philips M., et al. Real-time RT–PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer*, 2006; 94: 672–680.
197. Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer*. 2006; Apr 15;118(8): 2013-2019
198. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using

- immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood*. 1993; 82: 2605-2610.
199. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003; 100, 3983-3988.
  200. Hardingham JE, Grover P, Winter M, et al. Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer--20 Years of Progress. *Mol Med*. 2015; 21:S25–31.
  201. Bonnomet A, Synel L, Brysse A, et al. A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastasis of breast cancer. *Oncogene* 2012;31(33):3741-53.
  202. Allard WJ, Matera J, Miller MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 15;10(20):6897-904.
  203. Burz C, Pop VV, Buiga R, et al. Circulating tumor cells in clinical research and monitoring patients with colorectal cancer. *Oncotarget* 2018; 9 (36):24561-24571.
  204. Huang MY, Tsai HL, Huang JJ, Wang JY. Clinical Implications and Future Perspectives of Circulating Tumor Cells and Biomarkers in Clinical Outcomes of Colorectal Cancer. *Transl Oncol*. 2016; 9:340–347.
  205. Mehes G, Witt A, Kubista E, et al. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 2001; 159:17-20.
  206. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003; Oct;36 Suppl 1:59-72.
  207. Liu X, Fan D. The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Curr Pharm Des* 2015;21(10):1279-91.
  208. Jia S, Zhang R, Li Z, Li J. Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; 8:55632–45.
  209. Wang JY, Wu CH, Lu CY, et al. Molecular detection of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer using RT-PCR: significance of the prediction of postoperative metastasis. *World J Surg*. 2006; 30:1007–1013.
  210. Uen YH, Lu CY, Tsai HL, et al. Persistent presence of postoperative circulating tumor cells is a poor prognostic factor for patients with stage I-III colorectal cancer after curative resection. *Ann Surg Oncol* 2008;15(8): 2120–2128.



211. Lu CY, Uen YH, Tsai HL, et al. Molecular detection of persistent postoperative circulating tumour cells in stages II and III colon cancer patients via multiple blood sampling: prognostic significance of detection for early relapse. *Br J Cancer* 2011; 104(7): 1178–1184.
212. Lu CY, Tsai HL, Uen YH, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining clinical outcome to mFOLFOX chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer* 2013;108(4): 791–797.
213. Huang X, Gao P, Song Y, et al. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch System in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2015;15:202.
214. Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget*. 2015; 6:10697–711.
215. Ning Y, Zhang W, Hanna DL, et al. Clinical relevance of EMT and stem-like gene expression in circulating tumor cells of metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2018; 18:29–34.
216. Mostert B, Sieuwerts AM, Bolt-de Vries J, et al. mRNA expression profiles in circulating tumor cells of metastatic colorectal cancer patients. *Mol Oncol*. 2015; 9:920–932.
217. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:3213–3221.
218. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2009;20(7), 1223–1229.
219. Tol J, Koopman M, Miller MC, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol*. 2010; 21:1006–1012.
220. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2011; 102:1188–1192.
221. Sastre J, Maestro ML, Gomez-Espana A, et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. *Oncologist*. 2012; 17:947–955.

222. De Albuquerque A, Kubisch I, Stolzel U, et al. Prognostic and predictive value of circulating tumor cell analysis in colorectal cancer patients. *J Transl Med.* 2012; 10:222.
223. Barbazan J, Muinelo-Romay L, Vieito M, et al. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2014; 135:2633–2643.
224. Gazzaniga P, Raimondi C, Nicolazzo C, et al. The rationale for liquid biopsy in colorectal cancer: a focus on circulating tumor cells. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015; 15:925–932.